

**VŠB – TECHNICKÁ UNIVERZITA OSTRAVA**

**Hornicko-geologická fakulta**

Katedra environmentálního inženýrství



**Aktivita mikroorganismů v technogenních sedimentech  
odkaliště po těžbě antimonu**

The activity of microorganisms in the technogenic sediments of settling  
basins after mining of antimony

**Autoreferát k disertační práci**

**Autor:**

**Ing. Mgr. Kateřina Boturová**

**Školitel:**

**doc. Mgr. Hana Vojtková, Ph.D.**

Ostrava 2020

## **Abstrakt**

Disertační práce hodnotí aktuální stav kontaminace území staré environmentální zátěže po těžbě antimonových rud – odkaliště Poproč (Slovenská republika) s využitím mikroorganismů jako indikátorů současného stavu prostředí. Cílem disertační práce bylo na zájmovém území pomocí charakteristických znaků mikrobioty a potřebných analýz jejího stavu vyhodnotit současnou míru kontaminace zasaženého území odkaliště, a míru toxicity prostředí. Teoretická část této práce je zaměřena na úlohu autochtonní mikroflóry v prostředí po těžbě polymetalických rud; zabývá se úlohou mikroorganismů při snižování koncentrací toxických kovů a polokovů v prostředí a jejich úlohou v obnovení původní funkce postiženého prostředí. Experimentální část práce obsahuje analýzy fyzikálně-chemických charakteristik substrátů odkaliště. Biologická charakteristika byla stanovena na základě metod pro stanovení půdní mikrobiální biomasy, mikrobiální aktivity a metabolismu včetně ověření abundance a diverzity indigenních mikroorganismů. K ověření biotransformační aktivity mikrobioty v uvolňování antimonu a arsenu v technogenních substrátech odkaliště byly použity experimenty heterotrofního bioloužení, ve kterých byly aplikovány získané izoláty bakterií rodu *Bacillus* a mikroskopických vláknitých hub rodu *Aspergillus*. Na základě výsledků byl charakterizován stav zátěže prostředí ve vztahu k predikci dalšího vývoje a postupující revitalizaci zájmového území.

**Klíčová slova:** indigenní mikrobiota, odkaliště, kontaminace, biotransformace, bioloužení, arsen, antimon, *Bacillus*, *Aspergillus*

## **Abstract**

The dissertation deals with the present situation of the territorial background of the environmental burden after mining of antimony ores – sludge lagoon Poproč (Slovak Republic) with using microorganisms as indicators of the current state of the environment. The aim of the dissertation thesis was to evaluate the current level of contamination of the affected area of the sludge lagoon and the degree of environmental toxicity using the characteristics of microbiota and necessary analyzes of its condition. The theoretical part of this thesis focuses on the role of autochthonous microflora in the environment after the extraction of polymetallic ores; deals with the useful role of microorganisms on reducing concentrations of toxic metals and metalloids in the environment and its important part in renewal the original function of the affected environment. Experimental part of the thesis contains of physical-chemical's characteristics analyzes in the substrates of the sludge lagoon. Biological characterization was determined on the basis of methods for determination of soil microbial biomass, microbial activity and metabolism including verification of abundance and diversity of indigenous microorganisms. To verify the biotransformation activity of the microbiota in the release of antimony and arsenic in the technogenic substrates of the sludge lagoon, heterotrophic bioleaching experiments were used in which the obtained isolates of bacteria genus *Bacillus* and microscopic filamentous fungi *Aspergillus* were applied. A state of the environmental burden was defined on the basis of the results to predict further progress and the gradual revitalization of the area of interest was characterized.

**Key words:** indigenous microbiota, sludge lagoon, contamination, biotransformation, bioleaching, arsenic, antimony, *Bacillus*, *Aspergillus*

## **Obsah disertační práce**

1. Úvod.....	1
1.1 Cíle práce.....	2
2. Aktivita mikroorganismů v prostředí odkališť po důlní a průmyslové činnosti .....	3
2.1 Antropogenní znečištění kovy v posttěžební krajině a jejich vliv na mikroorganismy.....	3
2.1.1 Antropogenní znečištění antimonem a arsenem.....	5
2.1.2 Mikroorganismy v půdách kontaminovaných důlní činností.....	7
3. Mikrobiální indikátory antropogenního znečištění.....	9
3.1 Mikrobiální biomasa.....	10
3.2 Syntéza bakteriální DNA.....	11
3.3 Půdní respirace .....	11
3.4 Abundance půdních mikroorganismů.....	12
3.5 Diverzita půdních mikroorganismů.....	13
3.5.1 Identifikace mikroorganismů na základě genů .....	14
3.5.2 Identifikace mikroorganismů na základě biochemických profilů.....	14
3.5.3 Identifikace mikroorganismů na základě fyziologických vlastností..	15
3.6 Identifikace indigenních mikroorganismů a jejich využití v biotechnologiích .....	16
3.6.1 Rod <i>Bacillus</i> .....	16
3.6.2 Využití rodu <i>Bacillus</i> v průmyslových biotechnologiích .....	17
3.6.3 Rod <i>Aspergillus</i> .....	20
3.6.4 Využití rodu <i>Aspergillus</i> v průmyslových biotechnologiích .....	21

4.	Metody disertační práce .....	23
4.1	Zájmové území .....	23
4.2	Terénní odběr vzorků .....	26
4.3	Laboratorní analýzy .....	27
4.3.1	Chemické, fyzikálně-chemické a biologické analýzy .....	27
4.3.2	Mikrobiologické analýzy .....	32
4.3.3	Analýzy biotransformačních procesů .....	43
5.	Výsledky .....	48
5.1	Fyzikálně-chemická a biologická charakteristika vzorků substrátu .....	48
5.2	Mikrobiologická charakteristika vzorků z odkaliště .....	50
5.3	Identifikace kultivovatelných mikroorganismů .....	53
5.4.	Bioloužení s indigenní mikrobiotou .....	59
6.	Diskuze .....	71
7.	Shrnutí výsledků .....	80
8.	Závěr .....	83
9.	Seznam použité literatury .....	85
10.	Seznam obrázků .....	111
11.	Seznam tabulek .....	112
12.	Seznam grafů .....	113
13.	Seznam příloh .....	114

# 1. Úvod

Znečišťování životního prostředí v důsledku antropogenního působení má vliv nejen na jednotlivé složky životního prostředí, ale také na biosféru jako celek. Významnou složkou každé biocenózy je mikrobiota, kterou lze považovat za indikátor stavu prostředí, neboť jako kosmopolitně rozšířená součást všech ekosystémů je zodpovědná za koloběh prvků v přírodě, podílí se na mnoha významných geochemických procesech v terestriálních i akvatických ekosystémech a je díky svým jedinečným metabolickým charakteristikám a vlastnostem unikátní součástí života. Zajímavé metabolické schopnosti mikroorganismů jsou ve stále větší míře využívány v procesech moderních průmyslových biotechnologií, a to nejen při získávání nových produktů. Ze správné identifikace a taxonomického zařazení indigenních mikroorganismů lze vyvozovat určité předpoklady pro jejich fyziologické vlastnosti, které by mohly být dále využity při biotransformačních procesech různých toxikantů z prostředí, neboť na mikrobiologických základech je založena také většina remediačních biotechnologií současné doby. Mikroorganismy lokalit zatížených průmyslem a těžbou má tedy smysl studovat ve všech fyziologických, fenotypových i genotypových aspektech, protože změny v jejich abundanci i diverzitě jsou přímým ukazatelem aktuálního stavu prostředí – míry kontaminace zasaženého území včetně kvality půdy a vývoje její revitalizace *in situ*. Studium mikrobioty, která je obsahem této disertační práce, bylo provedeno na základě izolovaných kmenů bakterií a mikroskopických vláknitých hub včetně experimentálního ověření jejich úlohy při další biotransformaci antimonu a arsenu v technogenních substrátech v místech odkaliště Poproč, které vzniklo v důsledku ukládání flotačních kalů a dalšího odpadu po těžbě polymetalických rud, zejména rud antimonových. Na základě charakteristik autochtonních mikroorganismů bylo provedeno hodnocení aktuálního stavu prostředí odkaliště v místech, která přesto, že jsou již opuštěným územím, stále obsahují významné koncentrace antimonu a dalších toxických i potenciálně toxických kovů a představují tak vážné riziko pro okolní prostředí.

Disertační práce je zaměřena na známé území staré báňské zátěže na Slovensku a vznikla jako výsledek dlouhodobé mezinárodní spolupráce s odbornými pracovišti a univerzitami ve Slovenské republice, především Univerzitou Komenského v Bratislavě. Podstatná část disertační práce byla zpracována s podporou projektu Studentské grantové

soutěže SP2019/12, který byl součástí specifického výzkumu na Vysoké škole báňské – Technické univerzitě Ostrava pro podporu studentských vědecko-výzkumných aktivit.

## 1.1 Cíle práce

Cílem disertační práce je mikrobiální charakteristika území odkaliště Poproč – území staré environmentální zátěže po těžbě antimonové rudy. Cílem disertační práce bylo pomocí mikroorganismů zhodnotit stav a míru kontaminace zasaženého území, neboť stav mikrobioty je výchozím bodem k revitalizaci území.

Dalším cílem disertační práce je ověření biotransformační aktivity vybraných autochtonních mikroorganismů – bakterií a mikroskopických vláknitých hub v uvolňování antimonu (případně dalších toxických kovů a polokovů) z prostředí odkaliště, neboť jejich diverzita a abundance v prostředí má přímý vliv na výslednou geochemii sledovaných toxikantů. V procesech experimentální biotransformace byly přednostně aplikovány nové autochtonní izoláty biodegradačních bakterií a mikroskopických vláknitých hub, které byly získány z technogenních substrátů odkaliště Poproč.

Dílčí cíle disertační práce:

- hodnocení geochemických vlastností substrátů z odkaliště, především analýzy zvýšených koncentrací toxických a potenciálně-toxických kovů a jejich vlivů na mikroorganismy,
- biologická charakteristika území odkaliště po těžbě antimonu pomocí mikrobiologických indikátorů,
- charakteristika mikrobiálních společenstev v sedimentech odkaliště z odpadů po těžbě antimonu, kde pomocí identifikace kultivovatelné složky mikroorganismů byla ověřována také jejich abundance a diverzita,
- identifikace charakteristických zástupců mikroorganismů a interpretace jejich taxonomického zastoupení v kontextu s jejich možným využitím jako indikátorů znečištění a kontaminace technogenních půd,
- ověření biotransformační aktivity vybraných izolovaných mikroorganismů v uvolňování toxických kovů a polokovů, zejména antimonu a arsenu, a to v reálných vzorcích sedimentů z odkaliště Poproč.

## 2. Zájmové území

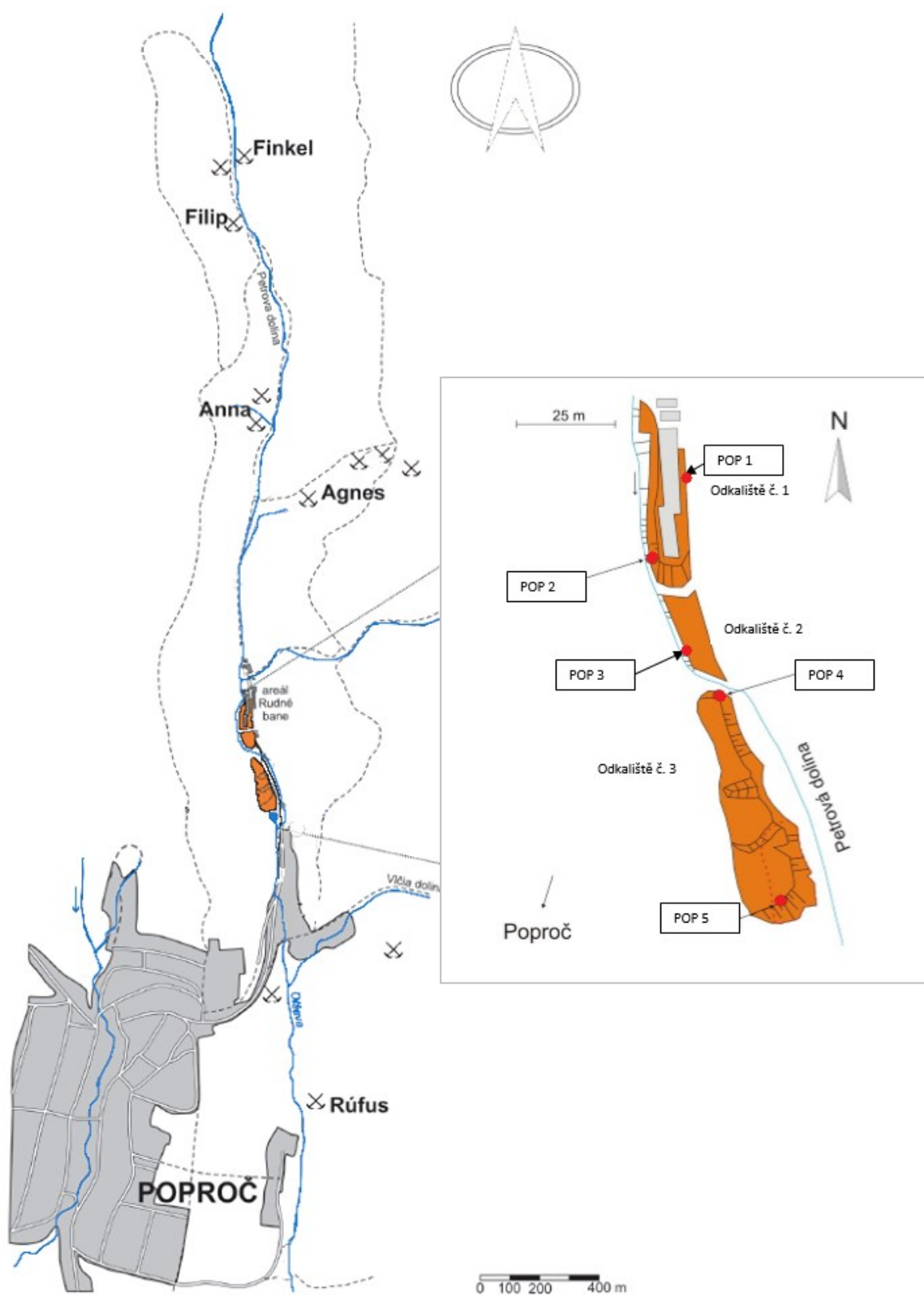
Opuštěné antimonové naleziště Poproč s přilehlými odkališti těžebního odpadu se nachází v Petrově údolí, severovýchodně od obce Poproč ve Slovenské republice (obr. 1). Antimonové naleziště Poproč patřilo k významným rudním ložiskům v jižní části Slovenského Rudohoří, které svou těžbu ukončilo již v roce 1965 (Jurkovič a kol., 2010). Vytěžená ruda měla polymetalický charakter a kromě významného podílu antimonu obsahovala také další toxické i potenciálně toxické kovy a polokovy (například As, Pb, Cu, Fe, Zn, Co, Cd, Ni i Au). Ruda byla zpracovávána flotační metodou, při které vznikál odpad, který byl deponován na tři různá odkaliště situovaná nad obcí Poproč.

Antimonové naleziště tvoří převážně struktury tvořené generickými granity (Rozložník a kol, 1987). Začátky hornictví v Poproči se datují od poloviny 18. století. Rozmach těžby začal od roku 1790, největší rozmach těžby však nastal až v 19. století. Těžba pokračovala až do r. 1965, kdy se provoz zastavil a postupně se začal likvidovat. Celkové množství vytěžené a zpracované rudy v letech 1931 – 1965 bylo 10,3 kt antimonu a 80 kg zlata (Grecula, 1995). Po báňské činnosti zůstaly v okolí Poproče haldy báňské hlušiny a tři odkaliště s deponovaným materiálem po flotační úpravě. Materiál z těchto hald se často využíval na výstavbu lesních cest a svážnic (Kaličiaková a kol., 1996). Vybudovaná odkaliště, která jsou situována v pravé části Petrové doliny (obr. 2) leží 0,5 – 1 km od obce. Odkaliště jsou situována v aluviu potoka Olšava, avšak ani z jedné strany nebyla zpevněná hrází a jejich materiál se volně rozplavuje do prostředí. Materiál z odkališť a hald používali a dodnes používají obyvatelé obce Poproč při stavbě a úpravě svých obydlí.



*Obrázek 1: Poloha antimonového naleziště Poproč*





**Obrázek 2:** Mapa odkaliště Poproč s vyznačenými odběrovými místy (upravena, Jurkovič a kol., 2010)

## **2.1 Terénní odběr vzorků**

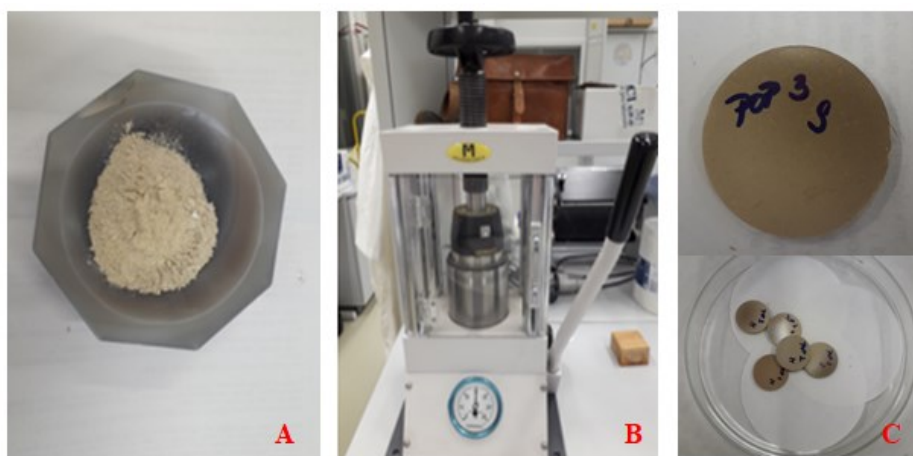
V zájmovém území odkaliště Poproč byly odebrány vzorky celkem z pěti odběrových míst (obr. 2). Vzorky byly odebírány pravidelně ze stejné lokality. Odběry vzorků technogenních půd a sedimentů byly realizovány systematicky ze severu na jih v různých místech tak, aby byla zahrnuta všechna odkaliště. Vzorky byly odebrány ručním vrtákem do hloubky 15 – 20 cm (cca 4 kg) a mechanicky z nich byly odstraněny větší části rostlin (kořeny, větvičky, atd.). Vzorky byly následně uzavřeny do igelitových pytlů a uloženy v přenosných chladících boxech. Po příchodu do laboratoře byly vzorky zpracovány standartním postupem – půda byla homogenizována, následně byla utvořena kruhová hromada a pomocí kvartace bylo získáno konečné množství vzorku (cca 2 kg). Vzorky byly dále vysušeny při laboratorní teplotě a dle normy ČSN ISO 3310-1 sítovány na frakci menší než 2 mm. Část vzorků byla použita na chemické, fyzikálně-chemické a biologické analýzy; část byla uchována v lednici při teplotě 4 °C do následujícího dne pro vykonání vstupních mikrobiologických analýz.

## **2.2 Metody disertační práce a laboratorní analýzy**

Znečišťování životního prostředí vedlejšími produkty báňské činnosti má velmi výrazný vliv na půdní složku ekosystémů. Antropogenně vytvořené environmentální zátěže související s těžbou nerostných surovin proto představují významné riziko i pro biosféru a je potřeba se jimi zabývat. Do popředí se dnes dostávají metody, které detailněji sledují a popisují základní vlastnosti půdního mikrobiálního společenstva. Jsou to především biochemické, genetické a fyziologické metody, které umožňují stanovit aktivitu, složení, počet mikroorganismů a jejich specifické vlastnosti v půdním mikrobiálním společenstvu a taky molekulární metody zahrnující technologie nukleových kyselin a analýzy fosfolipidových mastných kyselin, které umožňují sledovat diverzitu a strukturu mikrobiálního společenstva.

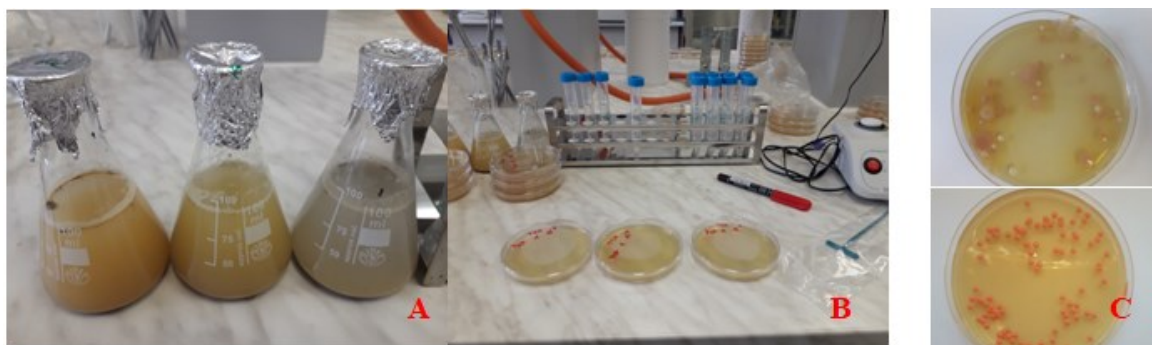
Základní laboratorní analýzy byly zaměřeny na ověření fyzikálně-chemických parametrů technogenních substrátů odkaliště v různých ročních obdobích, na mikrobiologické analýzy a také na analýzy biotransformačních procesů v experimentálním heterotrofním bioloužení. Z chemických, fyzikálně-chemických

a biologických analýz byla stanovena reakce půdy, ke které byla využita akreditovaná laboratoř MORAVA s. r. o ve Studénce. Vzorky půdních substrátů odkaliště byly stanoveny metodou SOP 44 (ČSN EN 15933) pro pH aktivní a metodou SOP 06 (ČSN ISO 10390: 2005) pro pH výměnné. Pro celkový organický uhlík byla využita metoda dle SOP 56 (ČSN EN 15936). Dále procentuální podíl sušiny, který byl stanoven dle gravimetrických metod normy ČSN ISO 11465: 1993, koncentrace toxických a potenciálně-toxických kovů a polokovů stanovena pomocí WD XRF spektrometrie (obr. 3). Pro tyto laboratorní analýzy byly využity laboratoře VŠB – TU Ostrava.



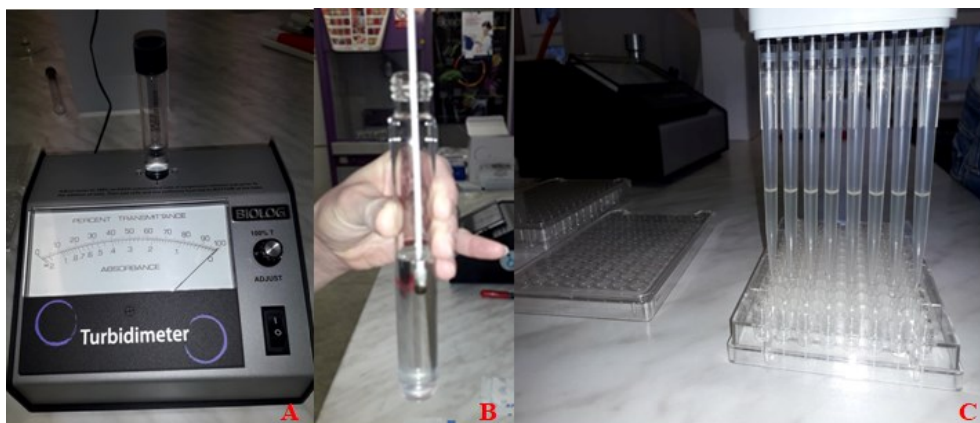
**Obrázek 3:** Příprava vzorku na lisování tablet; A – smíchání vzorku s pojivem, B – manuální hydraulický lis, C – připravené tablety na WD XRF spektrometrii (foto autorka)

V technogenních sedimentech vybrané lokality odkaliště Poproč byly stanovovány základní charakteristiky půdního společenstva autochtonních mikroorganismů, které byly posuzovány při hodnocení antropogenního znečištění. Abundance mikroorganismů byla zjišťována pomocí ředící metody (Schiner a kol, 1993, obr. 4).



**Obrázek 4:** Ředící metoda; A – příprava substrátu, B – rozočkování na živné médium, C – kolonie bakterií (foto autorka)

Mikroorganismy byly dále identifikovány pomocí systému BIOLOG™ (Biolog, USA). K identifikaci a fenotypové charakterizaci mikroorganismů byly použity systémy vysoce přesných a patentovaných biochemických testů GENIII a FF moderního testovacího systému BIOLOG™ MicroStation (obr. 5), pomocí kterých lze získat také velké množství informací o metabolismu mikroorganismů. Pro tyto metody byly využity mikrobiologická laboratoř na VŠB – TU Ostrava.



**Obrázek 5:** Příprava mikroorganismů na identifikaci systémem BIOLOG; A – turbidimetr, B – inokulace mikroorganismu, C – pipetování do mikrodestiček (foto autorka)

Stanovení půdní mikrobiální biomasy bylo provedeno pomocí fumigační extrakční metody (ČSN EN ISO 14240-2 (836441), Vance a kol, 1987, obr. 6) a také byla vypočítána bazální ( $\text{CO}_2\text{B}$ ) a potenciální ( $\text{CO}_2\text{P}$ ) respirace. Pro fumigační extrakční metodu byla využita chemická a fyzikální laboratoř na Katedře pedologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Komenského v Bratislavě.



**Obrázek 6:** Fumigace v exsikátoru (foto autorka)

Pomocí analýzy biotransformačních procesů bylo provedeno heterotrofní bioloužení s indigenní mikrobiotou. Pomocí procesů experimentálního bioloužení byla ověřována biotransformační aktivita indigenní mikrobioty v odkališti Poproč a její předpokládaná aktivita ve snižování toxických a potenciálně toxických kovů a polokovů, tedy arsenu a antimonu. Bioloužící experimenty probíhaly s reálnými vzorky odebranými z lokality Poproč s vysokými obsahy antimonu (nad 16 450 mg/kg) a arsenu (nad 5 260 mg/kg) za pomoci inokula mikroorganismů autochtonních mikroorganismů – byla vybrána mikroskopická vláknitá houba rodu *Apergillus* (*A. niger*) s označením pokusu POP 1: A1/1, A1/2, A1/3; POP 2: A2/1, A2/2, A2/3; POP 3: A3/1, A3/2, A3/3 a bakteriální kultura rodu *Bacillus* (*B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. subtilis* a *B. pumilus*) s označením pokusu POP 1: B1/1, B1/2, B1/3; POP 2: B2/1, B2/2, B2/3; POP 3: B3/1, B3/2, B3/3. Obě mikrobiální kultury byly v exponenciální fázi růstu. Další experimentální bioloužení bylo s konsorciem těchto dvou mikrobiálních rodů, označení pokusu POP 1: C1/1, C1/2, C1/3; POP 2: C2/1, C2/2, C2/3; POP 3: C3/1, C3/2, C3/3, a také nutná kontrola, kdy vzorky substrátu byly zality pouze čistým živným médiem (TSB a SB) bez jakéhokoliv inokula, označení POP 1: K1/1, K1/2, K1/3; POP 2: K2/1, K2/2, K2/3, POP 3: K3/1, K3/2, K3/3. Bioloužení bylo provedeno v laboratořích VŠB – TU Ostrava. Experimenty byly založeny ve 3 opakováních pro každý ze vzorků substrátů. Po 30 dnech kultivace byly vzorky přefiltrovány a přefiltrovaná média s uvolněnými kovy byla zaslána k analýze do akreditované laboratoře ALS Czech Republic, s. r. o v Praze. Vzorky výluhu byly dále laboratorně zpracovány dle CZ SOP D06 02 002 (US EPA 200.8, ČSN EN ISO 17294-2, US EPA 6020A, ČSN EN 16192, ČSN 75 7358 a příprava vzorku dle CZ SOP D06 02 J02 kap. 10.1 a 10.2). Stanovení prvků v těchto výluzích bylo provedeno metodou ICP-MS (**Inductively coupled plasma mass spectrometry**, hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem) a stechiometrické výpočty obsahů sloučenin z naměřených hodnot. Pro oddělený půdní substrát byla udělána analýza na obsah iontů kovů v laboratoři VŠB – TU Ostrava.

### 3. Výsledky disertační práce

#### 3.1 Fyzikálně-chemická a biologická charakteristika vzorků substrátu

Odkaliště lokality Poproč představuje území se starou environmentální zátěží. Kombinace parametrů popisujících stav mikrobiální komunity umožní obecnou extrapolaci výsledků na stav prostředí, ve kterém lze mikroorganismy využít jako ukazatele antropogenního znečištění a tedy stavu vývoje kvality půdy, její revitalizace (Brookes, 1995; Vojtková a Boturová, 2018). Jednou z výhod vyplývajících z kombinace mikrobiálních parametrů je včasné varování (tzv. early warning) (Jordan a kol., 1995), tato schopnost je přičítána vysoké citlivosti půdních mikroorganismů, jejich interakcím s prostředím na mikroskopické úrovni a tím jejich rychlé reakci na stres (Bloem a Breure, 2003; Šimonovičková a kol., 2013). Nicméně, pro správné vyhodnocení kvality půdy je třeba kromě kombinace různých mikrobiálních parametrů zkoumat také další biologické, fyzikální, chemické nebo geo-chemické charakteristiky prostředí právě spolu s mikrobiálními parametry (Nielsen a kol., 2002; Winding a kol., 2005; Burns a kol., 2006). Na základě těchto znalostí může být stanoven typ půdy a další základní vlastnosti substrátu (tab. 1).

**Tabulka 1:** Základní chemická a biologická charakteristika vzorků na lokalitě Poproč (průměrné hodnoty)

Vzorky	pH		TOC	Sušina (%)	Hloubka odběru (cm)	Druh vzorků
	H <sub>2</sub> O	KCl				
<b>POP 1</b>	5,8	5,3	0,20	87,13	0 – 20	písčitohlinitá
<b>POP 2</b>	5,1	4,4	0,15	88,08	0 – 20	hlinitopísčitá
<b>POP 3</b>	4,5	4,0	0,18	80,05	0 – 15	jílovitá

Při opakovaných analýzách pH se ukázalo, že většina odebraných substrátů má středně kyselé pH (hodnoty pH<sub>H<sub>2</sub>O</sub> 4,5 až 5,3 a hodnoty pH<sub>KCl</sub> 4,0 až 5,3). Celkový organický uhlík byl v rozmezí od 0,15 % do 0,20 %. Všechny studované substráty byly analyzovány na hodnoty obsahu základních toxických kovů a polokovů (tab. 2). Obsah všech pozorovaných chemických prvků stále vysoce překračuje mezní hodnoty.

**Tabulka 2:** Obsahy vybraných prvků vzorků odkaliště Poproč po suchém (S) a mokrém (M) sítování

Vzorky	POP1 S	POP1 M	POP2 S	POP2 M	POP3 S	POP3 M
Kovy a polokovy	mg/kg					
<b>As</b>	5266	4219	3366	3303	2973	2562
<b>Ba</b>	117	119	68	80	146	159
<b>Ce</b>	117	134	114	127	114	115
<b>Co</b>	1	3	<1	1	4	2
<b>Cr</b>	54	54	197	47	136	122
<b>Cu</b>	44	24	59	17	78	18
<b>Ga</b>	17	20	13	14	17	19
<b>La</b>	44	57	50	52	49	53
<b>Mo</b>	29	36	23	18	19	18
<b>Nb</b>	10	10	6	7	8	8
<b>Ni</b>	20	10	14	22	26	15
<b>Pb</b>	813	686	865	573	575	555
<b>Rb</b>	167	190	110	131	178	197
<b>Sb</b>	16455	12856	10967	7711	7805	7401
<b>Sc</b>	70	86	57	43	46	48
<b>Sn</b>	47	56	36	28	30	29
<b>Sr</b>	46	54	31	37	42	46
<b>V</b>	54	59	29	41	55	56
<b>Y</b>	51	55	53	59	45	46
<b>Zn</b>	45	173	23	103	44	91
<b>Zr</b>	159	195	99	106	118	108

Z výsledků uvedených v tab. 2 vyplývá, že všechny sledované substráty jsou vysoce kontaminovány toxickými kovy, zejména arsenem a antimonem. Nejvyšší obsah arsenu a antimonu ( $\text{As} \geq 5266 \text{ mg.kg}^{-1}$ ,  $\text{Sb} \geq 16455 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) byl zjištěn ve vzorcích POP1 odebraných z hloubky 0 – 20 cm. U všech vzorků byl také zjištěn zvýšený obsah olova a dalších toxických a potenciálně toxických kovů a polokovů.

Hudson-Edwards a kol. (2004) uvádějí, že je nepochybně velmi důležité znát celkovou koncentraci toxických a potenciálně toxických kovů a polokovů v půdách a sedimentech, protože tyto kovové ionty jsou v mnoha územích vázány právě na jemnozrnnou frakci, a tudíž jsou snadněji rozložitelnější v kapalném prostředí.

Z výsledků uvedených v tab. 2 shrnující porovnání mokrého a suchého síťování vzorků odebraných ze stejné lokality vyplývá, že toxické a potenciálně toxické prvky jsou částečně vázány na vodu. Nejvyšší koncentrace antimonu a arsenu byla ve vzorcích POP1 pro Sb: suché síťování 16 455 mg.kg<sup>-1</sup> / mokré síťování 12 856 mg.kg<sup>-1</sup>, pro As: suché síťování 5 266 mg.kg<sup>-1</sup> / mokré síťování 4 219 mg.kg<sup>-1</sup>; tím se vysvětlují rozdíly v obsahu kovů ve vzorcích po mokré a suchém síťování a také fakt, že u většiny sledovaných prvků byla naměřená vyšší koncentrace kovů po suchém síťování.

**Tabulka 3:** Obsahy základních sloučenin vzorků odkaliště Poproč po suchém (S) a mokré (M) síťování

Vzorky	POP1 S	POP1 M	POP2 S	POP2 M	POP3 S	POP3 M
Sloučeniny	%					
<b>Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	11,59	13,11	8,23	8,19	12,17	13,19
<b>CaO</b>	0,39	0,33	0,09	0,14	0,09	0,12
<b>Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	4,00	4,58	2,79	2,82	3,46	2,82
<b>K<sub>2</sub>O</b>	2,78	3,16	1,91	2,03	2,90	3,17
<b>MgO</b>	1,09	1,25	0,82	0,86	1,12	1,21
<b>MnO</b>	0,01	0,01	<0,01	0,01	0,01	0,01
<b>Na<sub>2</sub>O</b>	0,33	0,33	0,33	0,26	0,40	0,39
<b>P<sub>2</sub>O<sub>5</sub></b>	0,14	0,13	0,09	0,08	0,08	0,07
<b>SiO<sub>2</sub></b>	73,17	69,84	81,02	80,82	74,51	74,13
<b>SO<sub>3</sub></b>	0,23	0,23	0,28	0,36	0,24	0,18
<b>TiO<sub>2</sub></b>	0,46	0,54	0,32	0,30	0,39	0,40

### 3.2 Mikrobiologická charakteristika vzorků z odkaliště

Základní mikrobiální parametry byly stanoveny podle kritérií Nielsena a Windinga (2002) a zahrnují měření abundance a biologické diverzity půdních mikroorganismů, měření mikrobiální biomasy a měření celkového organického uhlíku, včetně identifikace kultivovatelných druhů indigenních mikroorganismů.

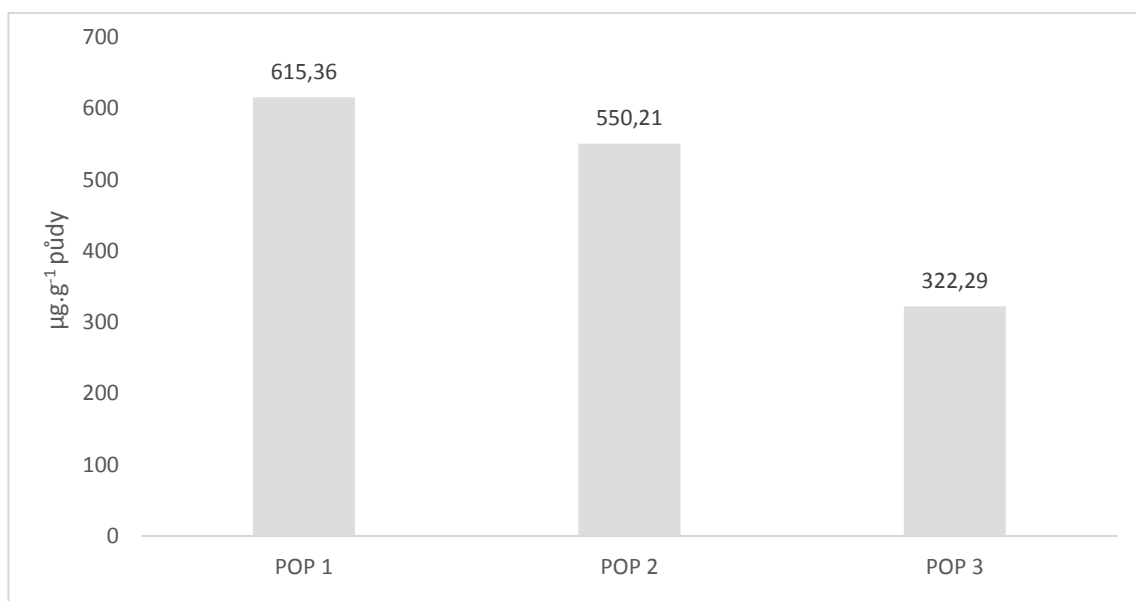


*Tabulka 4: Základní parametry mikrobiální biomasy  $C_{mic}$*

Označení vzorů z odkaliště	POP1	POP2	POP3
Počet vzorků	5	5	5
100 % PVK (%)	11,92	13,87	15,51
PKV max (ml.g <sup>-1</sup> )	0,4519	0,4982	0,7127
Přídavek vody pro 44 % PKV (ml.g <sup>-1</sup> )	0,0482	0,0726	0,0134
Uhlík bez fumigace (μg.g <sup>-1</sup> půdy)	67,44	55,70	28,21
Uhlík s fumigací (μg.g <sup>-1</sup> půdy)	615,36	550,36	322,29
Max (μg.g <sup>-1</sup> půdy)	656,63	621,25	324,56
Min (μg.g <sup>-1</sup> půdy)	535,55	515,13	309,19
Medián (μg.g <sup>-1</sup> půdy)	634,64	532,23	319,58
CO <sub>2</sub> -B (%)	23,81	20,09	10,91
CO <sub>2</sub> -P (%)	94,24	76,33	42,14

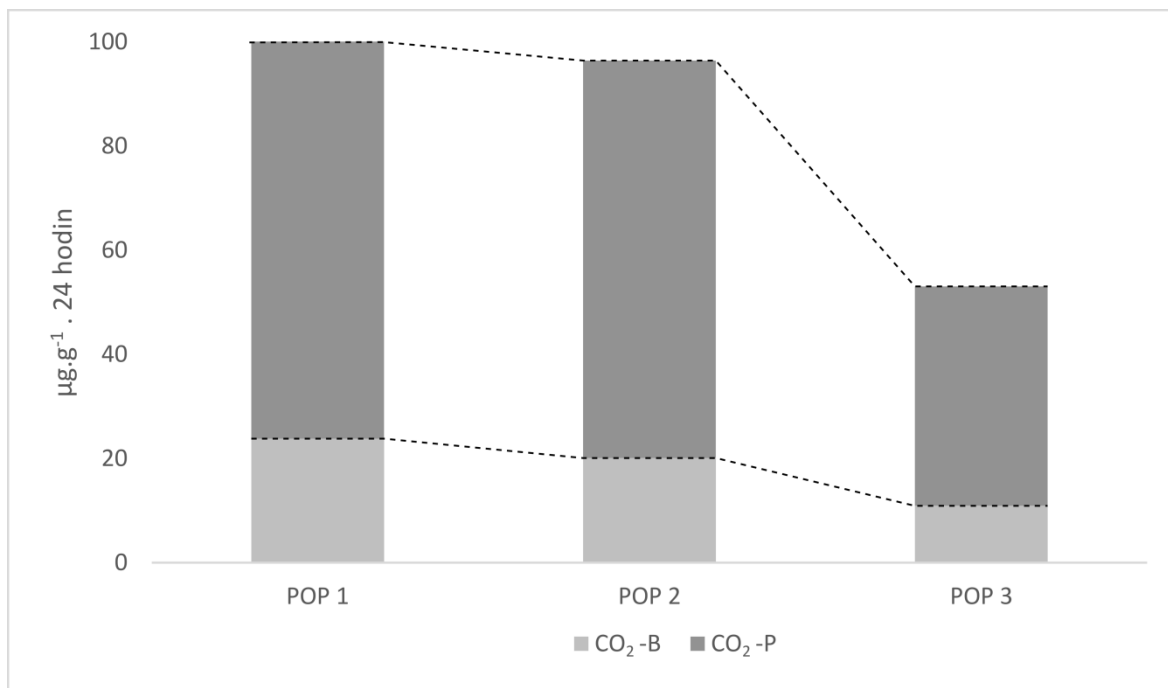
Hodnoty mikrobiální biomasy ( $C_{mic}$ ) byly stanovené pomocí fumigačně-extrakční metody (Vance et al., 1987). Jako velmi podobné se ukázaly výsledky vzorků z prvního odkaliště (POP1) a z druhého odkaliště (POP2), jejich průměrná hodnota se pohybuje v rozmezí 550,36 μg C – 615,63 C μg/g substrátu (tab. 4). Vůbec nejvyšší hodnota (656,63 C μg/g substrátu) byla zjištěna v jednom ze vzorků z odkaliště POP1, kde byl zjištěn přibližně o 100 % vyšší nárůst než v odkališti třetím (graf 1). Rozdíl ve výsledcích mikrobiální biomasy lze vysvětlit vyšším podílem fytocenózy v této lokalitě – v místě odkaliště POP1 je již souvislý rostlinný porost, především z mechu a nízké vegetace, typické pro tuto lokalitu, který tak vytváří vhodnější mikroklimatické podmínky pro existenci půdních mikroorganismů (z POP1 bylo izolováno 22 druhů bakterií, z toho 13 druhů rodu *Bacillus*). Aktivitu půdní mikrobiální biomasy lze také úzce spojit s vlhkostí půdy, teplotou půdy a zejména s biologickou využitelností organických látek (Akmal a kol., 2005; Liao a kol. 2007; Wright a Coleman, 2000). Nejnižší hodnoty mikrobiální biomasy byly zjištěny ve vzorcích substrátů z třetího odkaliště (POP3 – 309,19 C μg/g

substrátu). Tento výsledek lze dát do souvislosti s omezenou dostupností organických látek v daném půdním typu jílovité půdy, tím dochází ke snížení dostupnosti živin pro mikroorganismy a v konečném důsledku tak k omezenému zapojení mikroorganismů do biogeochemických cyklů (Wang a kol., 2011).



**Graf 1:** Hodnoty půdní biomasy ( $C_{mic}$ ) hodnocené pomocí fumigačně extrakční metody v analyzovaných vzorcích z odkaliště Poproč

Průměrná hodnota bazálního dýchání se zvyšovala směrem od vzorku POP3 (10,91  $\mu\text{g/g}$  substrátu) až po vzorky z POP1 (23,81  $\mu\text{g/g}$  substrátu). Ve vzorku z POP1 byla nalezena vůbec nejvyšší hodnota po-tiračního dýchání (graf 2), tato hodnota ukazuje na zvýšený podíl vegetace daného území. Oproti tomu, naměřené hodnoty bazálního dýchání mikroorganismů, které byly relativně nízké, byly pravděpodobně způsobeny vysokými obsahy potenciálně toxických polokovů (zejména As a Sb), neboť již dříve bylo prokázáno, že vysoký obsah polokovů může vést ke snížení produkce oxidu uhličitého mikroorganismy (Feketova a kol., 2016).



**Graf 2:** Bazální a potenciální dýchání (CO<sub>2</sub>-B; CO<sub>2</sub>-P) určené kvantifikací oxidu uhličitého uvolněného v procesu mikrobiální aktivity ve vyšetřovaných vzorcích odkaliště Poproč

Výsledky mikrobiální biomasy a bazálního dýchání lze považovat za významné půdní mikrobiální indikátory antropogenně znečištěného prostředí a ukazují na mikrobiální stabilitu a odolnost mikroorganismů vůči toxickým a potenciálně toxickým kovům a polokovům (Yuangen a kol., 2006; Zhang a kol., 2015).

### 3.3 Identifikace kultivovatelných mikroorganismů

Bylo prokázáno, že půdní mikrobiocenóza přežívá i při podmínkách vysokého výskytu toxických kovů a polokovů v substrátu; všechny provedené mikrobiologické analýzy ukázaly, že ve vzorcích dominovaly nesportující bakterie ( $126,75 - 219,65 \times 10^4$  KTJ) a aktinomycety ( $43,45 - 33,65 \times 10^4$  KTJ). Jde o skupinu r-strategů, která produkuje velké množství organismů na úkor druhového zastoupení. Výjimkou je bakteriální rod *Bacillus*, u něhož bylo identifikováno 13 zástupců a rod *Aspergillus* s 6 zástupci. Identifikované mikroorganismy z odkaliště shrnuje tabulka 5 a tabulka 6.

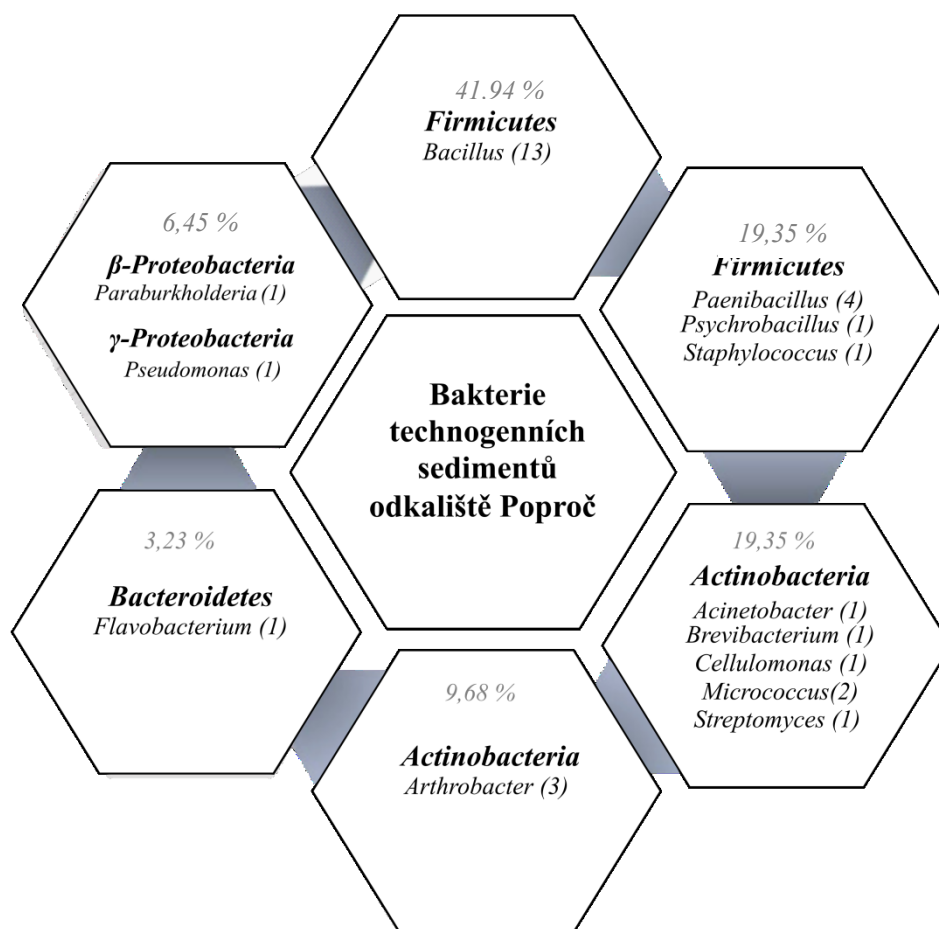
**Tabulka 5:** Diverzita bakterií v půdních vzorcích odkaliště Poproč

Taxonomická skupina	Druh	Vzorky			Prob	Sim
		POP1	POP2	POP3		
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus alcalophilus</i>	+	–	+	96	0,562
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens B</i>	+	+	+	100	0,728
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus atrophaeus/subtilis B</i>	+	+	–	93	0,617
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus cereus</i>	+	–	–	87	0,749
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus fastidiosus</i>	+	+	–	83	0,675
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	+	+	+	86	0,531
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus marococanus</i>	–	–	+	–	0,414
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	+	–	+	87	0,749
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus megaterium A</i>	+	+	+	94	0,796
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus mycides</i>	+	+	–	98	0,745
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus pumilus C</i>	+	+	+	100	0,656
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus simplex</i>	+	+	+	100	0,738
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	+	–	–	99	0,714
<i>Firmicutes</i>	<i>Paenibacillus illinoisensis</i>	–	–	+	87	0,542
<i>Firmicutes</i>	<i>Paenibacillus macerans</i>	–	–	+	96	0,562
<i>Firmicutes</i>	<i>Paenibacillus pabuli</i>	+	–	–	100	0,771
<i>Firmicutes</i>	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	+	+	–	100	0,793
<i>Firmicutes</i>	<i>Psychrobacillus soli</i>	+	+	–	100	0,694
<i>Firmicutes</i>	<i>Staphylococcus warneri</i>	+	–	–	95	0,549
<i>Actinobacteria</i>	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	–	–	+	95	0,692
<i>Actinobacteria</i>	<i>Arthrobacter flavus</i>	+	–	–	97	0,631
<i>Actinobacteria</i>	<i>Arthrobacter histidinolovorans</i>	+	+	+	99	0,610

<i>Actinobacteria</i>	<i>Arthrobacter ilicis</i>	–	+	+	96	0,582
<i>Actinobacteria</i>	<i>Brevibacterium otitidis</i>	+	+	–	86	0,531
<i>Actinobacteria</i>	<i>Cellulomonas hominis</i>	+	–	–	88	0,596
<i>Actinobacteria</i>	<i>Micrococcus luteus E</i>	+	+	+	94	0,646
<i>Actinobacteria</i>	<i>Micrococcus yunnanensis</i>	–	+	–	91	0,704
<i>Actinobacteria</i>	<i>Streptomyces aureus</i>	+	+	–	99	0,683
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacterium sasangense sp.</i>	–	–	+	89	0,523
<i>β-Proteobacteria</i>	<i>Paraburkholderia caledonica</i>	+	+	–	91	0,549
<i>γ-Proteobacteria</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	+	+	+	90	0,697
<b>Σ 31</b>		<b>22</b>	<b>18</b>	<b>16</b>		

V tab. 5 jsou zpracovány výsledky identifikace grampozitivních bakterií ze vzorků z odkaliště Poproč s využitím fenotypové identifikace pomocí systému BIOLOG a s využitím genotypové identifikace pomocí PCR.

Z uvedených přehledů v tabulce 5 vyplývá výskyt profilových kultivovatelných druhů bakterií. Mezi bakteriemi byly zjištěny zástupci rodů *Paenibacillus*, *Psychrobacillus*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Cellulomonas*, *Micrococcus*, *Streptomyces*, *Flavobacterium*, *Paraburkholderia* a *Pseudomonas*. Bylo zjištěno, že mezi druhy s nejvyšší potvrzenou abundancí v substrátech odkaliště patří bakterie rodu *Bacillus*. Na základě podrobnější taxonomické analýzy bylo zjištěno, že izolované bakterie tvoří pouze čtyři kmeny: *Firmicutes* (61,29 %), *Actinobacteria* (29,03 %), *β* a *γ-Proteobacteria* (6,45 %) a *Bacteroidetes* (3,23 %). Kmeny *Proteobacteria* a *Firmicutes* byly přítomny ve všech vzorcích ze studovaných substrátů, přičemž druhoví zástupci rodu *Bacillus* představují majoritní část kultivovatelných bakterií ve většině vzorků (41,94 %). Výsledky shrnující zjištěný procentuální podíl bakterií technogenních sedimentů odkaliště Poproč znázorňuje graf 3.



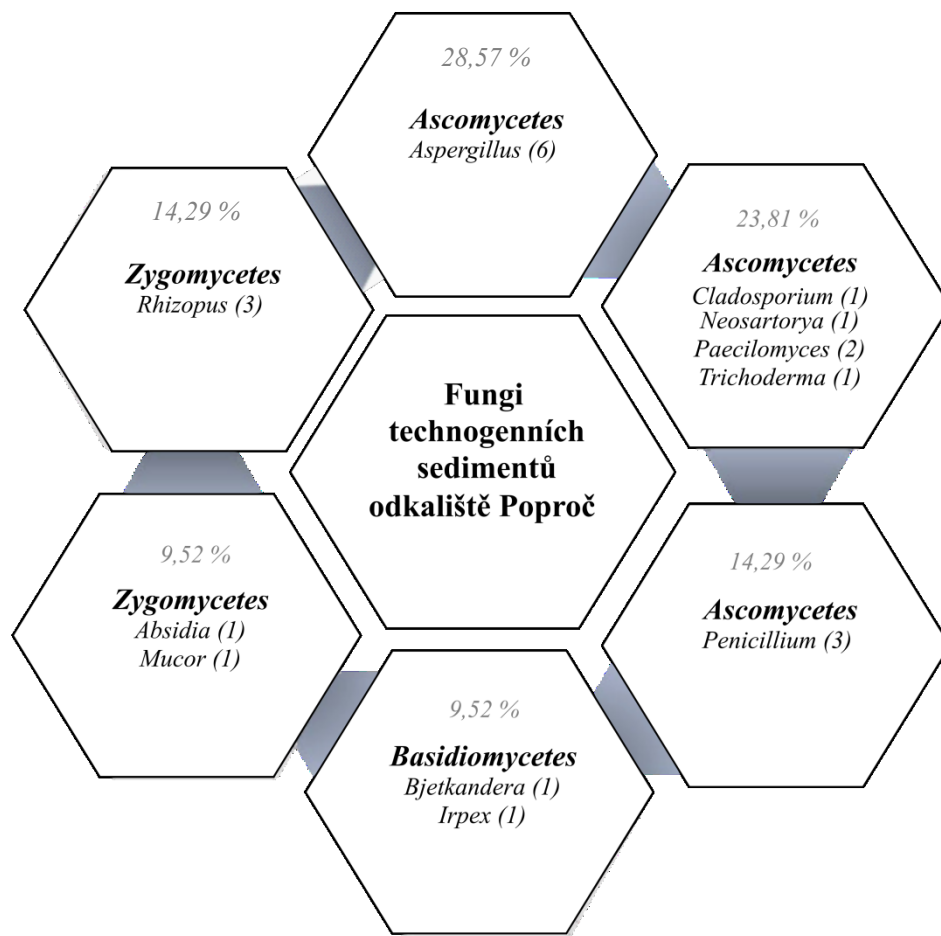
**Graf 3:** Procentuální podíl bakterií technogenních sedimentů odkaliště Poproč

Z výsledků výskytu mikroskopických hub ve vzorcích vyplývá, že houby s nejvyšší četností tvoří rod *Aspergillus* (28,57 %), dalšími kultivovanými houbami byli zástupci z rodů *Cladosporium*, *Neosartorya*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Bjerkandera*, *Irpex*, *Absidia*, *Mucor* a *Rhizopus*. Na základě podrobnější taxonomické analýzy bylo zjištěno, že izolované mikroskopické houby tvoří pouze 3 kmeny, a to *Ascomycota* (68,18 %), *Basidiomycota* (9,52 %) a *Zygomycota* (23,81 %)

Výsledky identifikace mikroskopických vláknitých hub ze vzorků substrátu odkaliště Poproč pomocí systému BIOLOG uvádí tab. 6, graf 4, obr. 7.

**Tabulka 6:** Diverzita mikroskopických vláknitých hub v půdních vzorcích odkaliště Poproč

Taxonomická skupina	Druh	Vzorky			Prob	Sim
		POP 1	POP 2	POP 3		
<i>Ascomycetes</i>	<i>Aspergillus clavatus</i>	+	–	–	99	0,606
<i>Ascomycetes</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	+	–	+	99	0,630
<i>Ascomycetes</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	+	+	+	98	0,768
<i>Ascomycetes</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>	+	+	–	96	0,593
<i>Ascomycetes</i>	<i>Aspergillus niger</i>	+	+	+	100	0,824
<i>Ascomycetes</i>	<i>Aspergillus versicolor</i>	+	–	–	93	0,521
<i>Ascomycetes</i>	<i>Cladosporium</i> sp.	+	–	–	95	0,677
<i>Ascomycetes</i>	<i>Neosartorya fischeri</i>	+	–	+	100	0,746
<i>Ascomycetes</i>	<i>Paecilomyces marquandii</i>	+	+	–	96	0,671
<i>Ascomycetes</i>	<i>Paecilomyces variotii</i>	+	–	–	–	0,423
<i>Ascomycetes</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>	–	+	–	100	0,752
<i>Ascomycetes</i>	<i>Penicillium oxalicum</i>	+	+	–	99	0,721
<i>Ascomycetes</i>	<i>Penicillium simplicissimum</i>	+	–	–	86	0,542
<i>Ascomycetes</i>	<i>Trichoderma harzinum</i>	+	–	–	96	0,689
<i>Basidiomycetes</i>	<i>Bjerkandera adusta</i>	–	+	–	98	0,625
<i>Basidiomycetes</i>	<i>Irpex lacteus</i>	–	–	+	98	0,738
<i>Zygomycetes</i>	<i>Absidia glauca</i>	+	–	–	99	0,811
<i>Zygomycetes</i>	<i>Mucor plumbeus</i>	–	–	+	86	0,4
<i>Zygomycetes</i>	<i>Rhizopus nigricans</i>	–	+	–	86	0,584
<i>Zygomycetes</i>	<i>Rhizopus orizae</i>	+	+	–	98	0,651
<i>Zygomycetes</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>	+	–	–	100	0,735
	<b>Σ 21</b>	<b>16</b>	<b>9</b>	<b>6</b>		



**Graf 4:** Procentuální podíl mikroskopických vláknitých hub technogenních sedimentů odkaliště Poproč



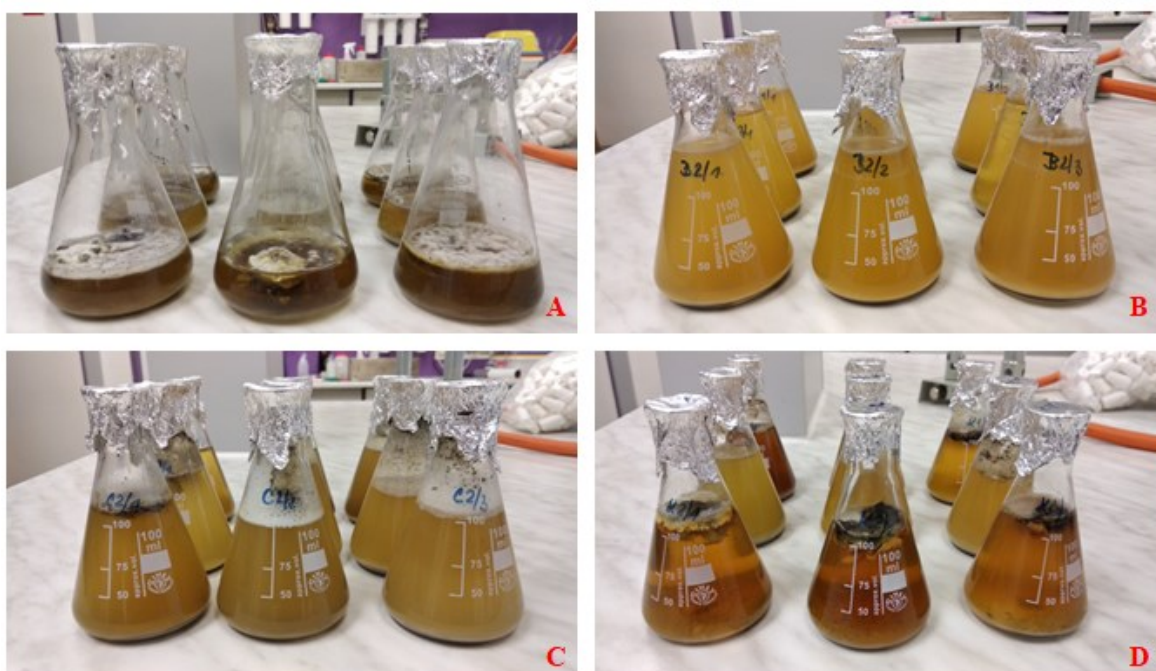
**Obrázek 7:** Identifikované mikroskopické vláknité houby – *Aspergillus niger* (A), *Penicillium chrysogenum* (B) a *Aspergillus fumigatus* (C) (foto autorka)



### 3.4. Bioloužení s indigenní mikrobiotou

Experimenty bioloužení vzorků z odkaliště POP1 – POP3 byly provedeny s aplikací mikroorganismů o nejvyšší abundanci – s bakteriemi *Bacillus* a houbami *Aspergillus* a bylo sledováno, jaký vliv mají uvedené mikroorganismy na biotransformaci toxických kovů a polokovů, především arsenu a antimonu v kontaminovaných substrátech odkaliště (obr. 8). Analýzy obsahu antimonu a arsenu po 30denním statickém bioloužení byly stanoveny pomocí WD XRF spektrometrie. Výsledky bioloužení vzorků substrátů z odkaliště POP1 – POP3 uvádí tab. 7.

V procesu bioloužení byly sledovány také ostatní toxické a potenciálně-toxické kovy a polokovy. Při porovnání průměrných hodnot toxických kovů a polokovů v substrátu (graf 5) bylo potvrzeno, že mikroorganismy mají vliv na změnu mobility toxických kovů a polokovů a podporují jejich biotransformaci, zejména bioakumulací a biovolatilizací. Přehled výsledků uvádí tab. 8, 9 a graf 5, 6.

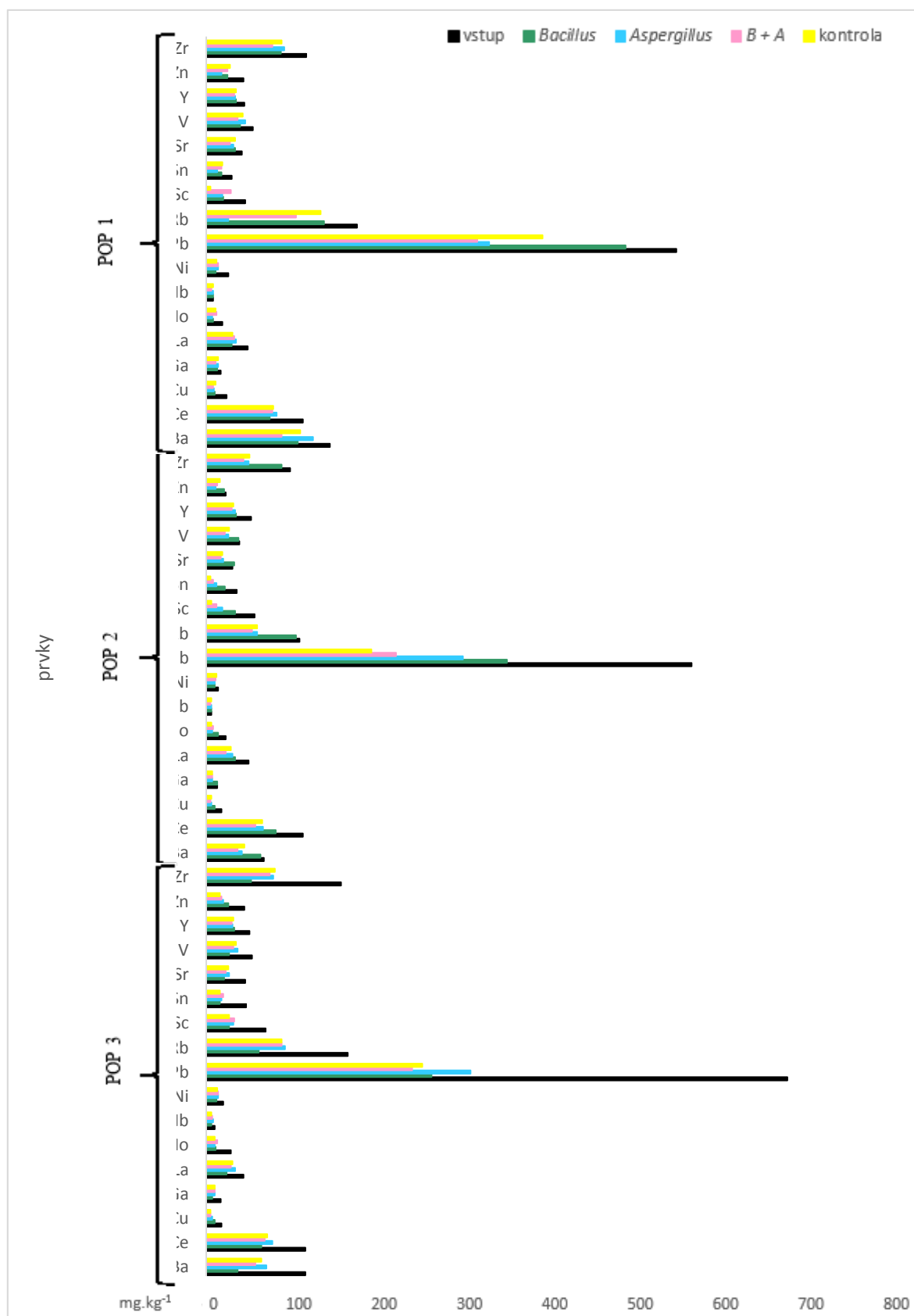


**Obrázek 8:** Bioloužení 30. den; A – vzorky A1/1 – A3/3 po bioloužení rodem *Aspergillus*, B – vzorky B1/1 – B3/3 po bioloužení rodem *Bacillus*, C – vzorky C1/1 – C3/3 po bioloužení konsorciem, D – kontrolní vzorky K1/1 – K3/3 po bioloužení autochtonní mikrobiotou (foto autorka)

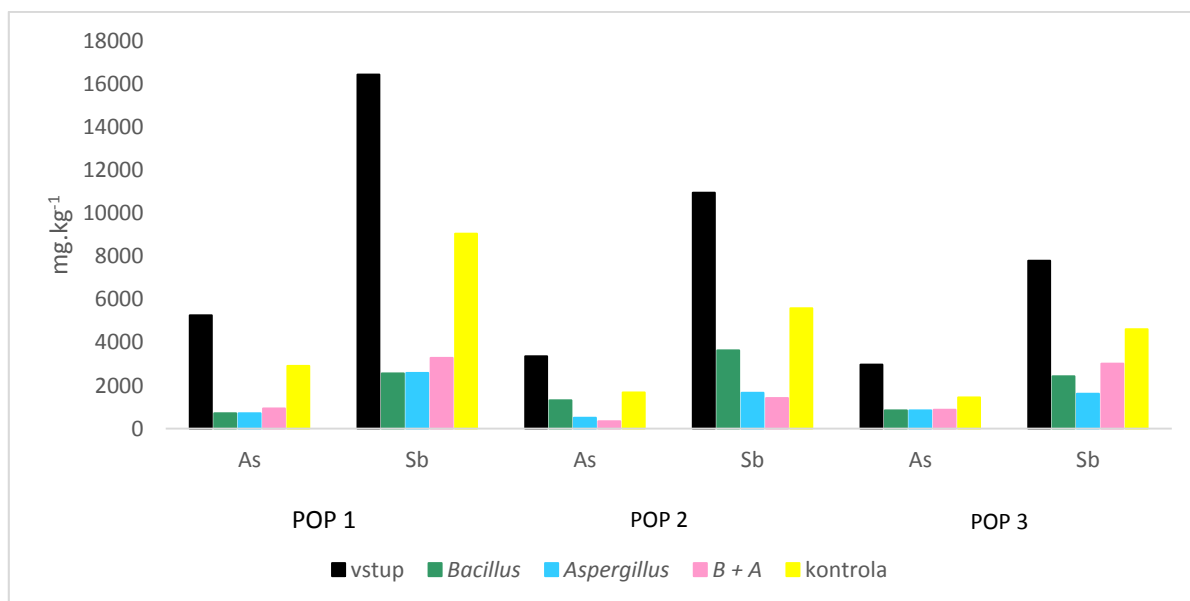
**Tabulka 7:** Obsah toxických kovů, polokovů a sloučenin ve vzorcích substrátu po 30 denním bioloužení (průměrné hodnoty ze 3 opakování každého experimentu včetně kontrolních vzorků bez aplikovaných mikroorganismů)

prvky	POP1	POP2	POP3	POP1 A1-A3	POP2 A1-A3	POP3 A1-A3	POP1 B1-B3	POP2 B1-B3	POP3 B1-B3	POP1 C1-C3	POP2 C1-C3	POP3 C1-C3	POP1 K1-K3	POP2 K1-K3	POP3 K1-K3
	Vstupní hodnoty (mg.kg <sup>-1</sup> )			Průměrné hodnoty po bioloužení (mg.kg <sup>-1</sup> )											
As	5266	3366	2973	719	508,3	851,3	715	1316,7	849,3	941	344	875,3	2916	1681	1452
Ba	117	68	146	71	42	126	37	64	108	58	37	89	65	45	111
Ce	117	114	114	78	67	83	65	82	75	69	58	78	72	66	79
Cr	254	197	136	286	197	124	227	107	47	316	399	173	393	526	275
Cu	18	18	24	7	6	9	10	10	10	5	5	8	5	6	11
Ga	17	13	17	10	7	14	7	13	13	10	7	11	10	7	14
La	44	50	49	34	31	35	24	34	30	29	23	33	31	29	31
Mo	29	23	19	10	7	7	11	14	8	13	8	12	10	6	11
Nb	10	6	8	8	6	8	6	6	8	7	5	6	6	6	8
Ni	20	14	26	14	10	14	12	10	11	14	11	14	13	12	12
Pb	686	573	555	312	303	334	266	355	495	243	224	320	255	195	397
Rb	167	110	178	93	60	26	62	106	139	89	54	106	89	60	135
Sb	16455	10967	7805	2589	1668	1625	2567	3641	2437	3292	1422	3024	9063	5593	4623

Sc	70	57	46	32	19	19	27	34	20	33	12	29	27	6	5
Sn	47	36	30	18	12	13	16	22	18	20	8	18	16	5	19
Sr	46	31	42	27	20	32	21	33	34	23	17	28	26	19	34
V	54	39	55	37	26	46	27	38	40	32	22	37	35	27	43
Y	51	53	45	31	34	34	33	35	35	30	30	33	32	32	35
Zn	45	23	44	20	11	18	26	21	25	18	13	25	16	16	28
Zr	159	99	118	79	50	92	53	89	88	75	44	78	81	51	89
sloučeniny	POP1	POP2	POP3	POP1 A1-A3	POP2 A1-A3	POP3 A1-A3	POP1 B1-B3	POP2 B1-B3	POP3 B1-B3	POP1 C1-C3	POP2 C1-C3	POP3 C1-C3	POP1 K1-K3	POP2 K1-K3	POP3 K1-K3
	%														
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	4,00	2,79	3,46	1,72	0,98	1,66	1,56	2,04	1,55	1,62	1,02	1,61	1,45	1,38	1,88
MnO	1,09	0,82	1,12	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
TiO <sub>2</sub>	0,46	0,32	0,39	0,32	0,21	0,34	0,21	0,32	0,30	0,25	0,17	0,29	0,31	0,20	0,32



**Graf 5:** Výsledky bioloužení toxických kovů a polokovů v substrátu odkališť Poproč (mg.kg<sup>-1</sup>) bez arsenu a antimonu



**Graf 6:** Výsledky bioloužení arsenu a antimonu v substrátu ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ), srovnání ve všech odkalištích

Stanovení Sb a As ve vzorcích po bioloužení bylo provedeno metodou **hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem** (ICP-MS), dle metodického pokynu ČSN EN ISO 17294-2 (Parkins a kol., 2005). Vzorky byly před analýzou homogenizovány a mineralizovány kyselinou dusičnou. Analýza na obsah iontů kovů byla provedena pro oddělený půdní substrát.

Výsledky shrnující schopnost aplikovaných mikroorganismů – bakterií rodu *Bacillus* a mikroskopických hub *Aspergillus niger* bioakumulovat a biovolatilizovat As a Sb je uvedena v tabulkách 8 a 9. Výsledky biovolatilizace byly vypočteny jako rozdíl mezi obsahem kovu (polokovu) ve vstupních vzorcích a obsahem kovu v biomase mikroorganismu a vyloučeného množství v kultivačním médiu. Bylo zjištěno, že mikroskopické houby *Aspergillus* byly schopny akumulovat ve své biomase všechny analyzované chemické prvky lépe než bakterie rodu *Bacillus*. Na druhé straně, u bakterií *Bacillus* byla zaznamenána vyšší schopnost biovalatilizace, která byla teoreticky vypočítána z celkové biomasy odvozené z extrakčně fumigační metody (na rozdíl od biomasy hub, biomasu bakterií z bioloužících experimentů nebylo možné odebrat v dostatečném množství k analýze zvolenou metodou).

Třicetidenní statické bioloužení arsenu a antimonu shrnují tabulky 8. a 9 (grafy 7 a 8). Z výsledků bioloužení vyplývá, že pomocí bakterií rodu *Bacillus* bylo průměrně odstraněno 73,33 % Sb (POP1 84,4 %, POP2 66,8 %, POP3 68,78 %) a 72,91 % As (POP1

86,42 %, POP2 60,88 %, POP3 71,43 %). Tyto výsledky ukazují, že účinnost pomocí hub je výrazně vyšší, neboť pomocí hub rodu *Aspergillus* bylo průměrně odstraněno 82,75 % Sb (POP1 84,27 %, POP2 84,79 %, POP3 79,18 %) a 81,03 % As (POP1 86,9 %, POP2 84,9 %, POP3 71,36 %). Snížení antimonu pomocí smíšeného konsorcia bakterií a hub bylo 76,09 % (POP1 79,99 %, POP2 87,03 %, POP3 61,26 %), arsenu 80,82 % (POP1 82,13 %, POP2 89,78 %, POP3 70,56 %), což odpovídá kombinací výsledků obou skupin mikroorganismů.

Také výsledky bioakumulace Sb bakteriemi *Bacillus* byly nízké – 5,98 % (POP1 4,43 %, POP2 7,51 %, POP3 6 %) stejně jako výsledky bioakumulace As – 18,52 % (POP1 13,52 %, POP2 26,86 %, POP3 15,18 %). Naopak, biovolatilizační schopnost bakterií byla u antimonu 93,50 % (POP1 95,34 %, POP2 91,84 %, POP3 93,33 %) a u arsenu 76,46 % (POP1 74,18 %, POP2 71,39 %, POP3 83,81 %). V porovnání celková bioakumulace Sb pomocí kmene *Aspergillus*, která činila 22,35 % (POP1 13,22 %, POP2 27,29 %, POP3 26,54 %) a As 80,47 % (POP1 56,26 %, POP2 91,72 %, POP3 93,46 %). Biovolatilizační schopnost byla vypočítána u antimonu na 76,42 % (POP1 86,05 %, POP2 71,84 %, POP3 71,36 %) a u arsenu na 18,13 % (POP1 42,72 %, POP2 6,88 %, POP3 4,86 %). Celková bioakumulace po přidání konsorcia těchto mikroorganismů činila u Sb 20,93 % (POP1 15,56 %, POP2 20,80 %, POP3 26,44 %), u As byla 36,17 % (POP1 29,60 %, POP2 33,96 %, POP3 45,96 %). Biovolatilizace byla u antimonu vypočítána na 77,77 % (POP1 84,14 %, POP2 77,87 %, POP3 71,29 %) a u arsenu na 62,76 % (POP1 69,71 %, POP2 64,54 %, POP3 52,03 %).

Pomocí kontrolních vzorků bez inokulace mikroorganismů (jen s indigenní mikrobiotou) byla ověřena schopnost celkové autochtonní mikroflóry loužit toxické a potenciálně toxické kovy a polokovy. Celková bioakumulace mikroorganismů byla u antimonu 17,63 % (POP1 13,16 %, POP2 17,08 %, POP3 22,66 %), u arsenu 60,31 % (POP1 54,09 %, POP2 62,86 %, POP3 63,97 %). Biovolatilizační schopnost byla vypočítána u antimonu na 80,18 % (POP1 85,19 %, POP2 79,81 %, POP3 75,54 %) u arsenu 36,94 % (POP1 43,84 %, POP2 33,38 %, POP3 33,59 %). Celkové odstranění antimonu 44,90 % (POP1 44,93 %, POP2 49,01 %, POP3 40,77 %), arsenu 48,62 % (POP1 44,63 %, POP2 50,06 %, POP3 51,16 %), (tab. 8 a 9).

**Tabulka 8:** Obsah Sb v substrátu před a po bioloužení rodem bakterií *Bacillus* B1/1 – B3/3, mikroskopickou houbou rodu *Aspergillus* A1/1 – A3/3, konsorciem bakterií *Bacillus* a *Aspergillus* C1/1 – C3/3 a kontrolou K1/1 – K3/3

označení odkaliště	označení vzorku	vstupní hodnoty <sup>a)</sup>	zůstatek v sedimentu <sup>a)</sup>	průměr	převod do roztoku + bakterie	průměr	biomasa průměr <sup>b)</sup>	celková biovolatilizace	% odstranění Sb ze vstupu pomocí bakterií rodu <i>Bacillus</i>
		(mg.kg <sup>-1</sup> )	(mg.kg <sup>-1</sup> )	(mg.kg <sup>-1</sup> )	(mg.kg <sup>-1</sup> )*	(mg.kg <sup>-1</sup> )	(mg.kg <sup>-1</sup> )*	%	%
POP 1	B1/1 B1/2 B1/3	16455	2448 2664 2589	2567	37,90 30,50 25,50	31,30	615,36 **	95,34 ***	84,40
v %		100		15,60		0,23	4,43		
POP 2	B2/1 B2/2 B2/3	10967	3767 3583 3573	3641	54,00 46,90 42,80	47,90	550,36 **	91,84 ***	66,80
v %		100		49,70		0,65	7,51		
POP 3	B3/1 B3/2 B3/3	7805	2655 2225 2431	2437	38,60 32,70 36,40	35,90	322,29 **	93,33 ***	68,78
v %		100		31,22		0,67	6,00		
označení odkaliště	označení vzorku	vstupní hodnoty <sup>a)</sup>	zůstatek v sedimentu <sup>a)</sup>	průměr	převod do roztoku	průměr	biomasa průměr <sup>b)</sup>	celková biovolatilizace	% odstranění Sb ze vstupu pomocí rodu <i>Aspergillus</i>
		(mg.kg <sup>-1</sup> )	(mg.kg <sup>-1</sup> )	(mg.kg <sup>-1</sup> )	(mg.kg <sup>-1</sup> )*	(mg.kg <sup>-1</sup> )	(mg.kg <sup>-1</sup> )	%	%
POP 1	A1/1 A1/2 A1/3	16455	2491 2784 2492	2589	114,00 91,50 98,00	101,17	1845	86,05	84,27
v %		100		15,73		0,73	13,22		
POP 2	A2/1 A2/2 A2/3	10967	1701 1643 1660	1668	57,30 96,10 90,40	81,27	2538	71,84	84,79
v %		100		15,21		0,87	27,29		
POP 3	A3/1 A3/2 A3/3	7805	1787 1545 1543	1625	101,00 117,50 170,30	129,60	1640	71,36	79,18
v %		100		20,82		2,10	26,54		

označení odkaliště	označení vzorku	vstupní hodnoty <sup>a)</sup>	zůstatek v sedimentu <sup>a)</sup>	průměr	převod do roztoku	průměr	biomasa průměr <sup>b)</sup>	celková biovolatilizace	% odstranění Sb ze vstupu pomocí rodu konsorcia B + A
		(mg.kg <sup>-1</sup> )	(mg.kg <sup>-1</sup> )	(mg.kg <sup>-1</sup> )	(mg.kg <sup>-1</sup> )	(mg.kg <sup>-1</sup> )	(mg.kg <sup>-1</sup> )	%	
POP 1	C1/1 C1/2 C1/3	16455	3347 3208 3321	3292	39,80 26,10 54,10	40,00	2048	84,14	79,99
v %		100		20,01		0,30	15,56		
POP 2	C2/1 C2/2 C2/3	10967	1419 1427 1420	1422	147,00 126,00 108,00	127,00	1985	77,87	87,03
v %		100		12,97		1,33	20,80		
POP 3	C3/1 C3/2 C3/3	7805	3207 2694 3171	3024	51,10 98,40 175,40	108,30	1264	71,29	61,26
v %		100		38,74		2,27	26,44		
označení odkaliště	označení vzorku	vstupní hodnoty <sup>a)</sup>	zůstatek v sedimentu <sup>a)</sup>	průměr	převod do roztoku	průměr	biomasa průměr <sup>b)</sup>	celková biovolatilizace	% odstranění Sb ze vstupu - kontrola
		mg.kg <sup>-1</sup>	(mg.kg <sup>-1</sup> )	(mg.kg <sup>-1</sup> )	(μg.l <sup>-1</sup> )	(μg.l <sup>-1</sup> )	(mg.kg <sup>-1</sup> )	%	%
POP 1	K 1/1 K 1/2 K 1/3	16455	8995 9620 8574	9063	56,10 91,30 218,00	121,8	973	85,19	44,93
v %		100		55,07		1,65	13,16		
POP 2	K 2/1 K 2/2 K 2/3	10967	5822 5538 5419	5 593	189,00 146,00 166,00	167,00	918	79,81	49,01
v %		100		50,99		3,11	17,08		
POP 3	K 3/1 K 3/2 K 3/3	7805	5176 4401 4292	4623	68,60 31,50 71,20	57,10	721	75,54	40,77
v %		100		59,23		1,80	22,66		

\* přepočítáno z l na kg dle Helmenstine a kol. (2018), tzn. pro vlastnosti vody (densita H<sub>2</sub>O) při 22 °C přepočet l = 0, 9975 kg

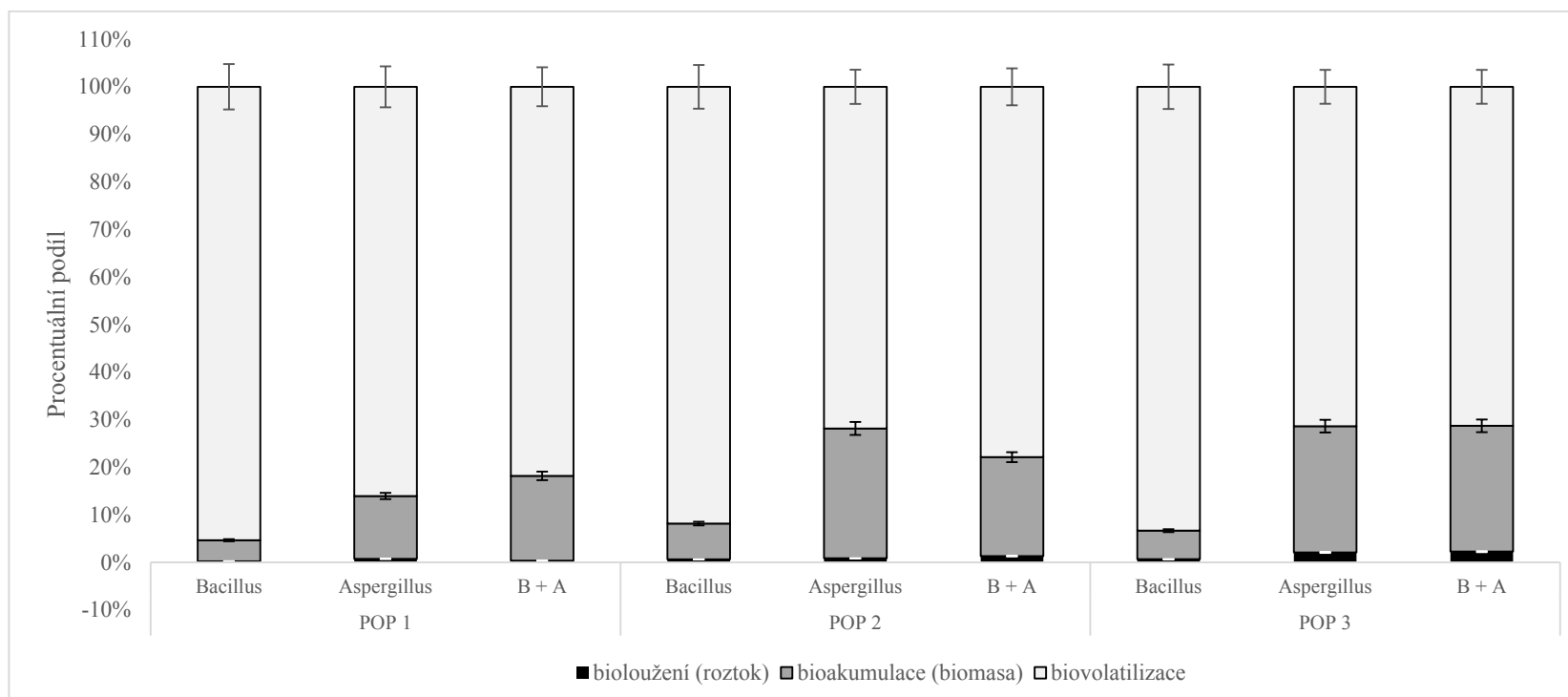
\*\* hodnota odvozená z fumigačně extrakční metody

\*\*\* celková biovolatilizace je pouze odvozená

a) nejistota měření (±10 %)

b) nejistota měření (±20 %)





**Graf 7:** Bioakumulační a biovolatilizační účinnost bakterií rodu *Bacillus*, mikroskopických hub rodu *Aspergillus* a konsorcia těchto mikroorganismů po 30 denním bioloužení antimonu v labororních podmínkách

**Tabulka 9:** Obsah As v substrátu před a po bioloužení rodem bakterií *Bacillus* B1/1 – B3/3, mikroskopickou houbou rodu *Aspergillus* A1/1 – A3/3, konsorciem bakterií *Bacillus* a *Aspergillus* C1/1 – C3/3 a kontrolou K1/1 – K3/3

označení odkaliště	označení vzorku	vstupní hodnoty <sup>a)</sup>	zůstatek v sedimentu <sup>a)</sup>	průměr	převod do roztoku + bakterie	průměr	biomasa průměr <sup>b)</sup>	celková biovolatilizace	% odstranění As ze vstupu pomocí bakterií rodu <i>Bacillus</i>
		(mg.kg <sup>-1</sup> )	(mg.kg <sup>-1</sup> )	(mg.kg <sup>-1</sup> )	(mg.kg <sup>-1</sup> )*	(mg.kg <sup>-1</sup> )	(mg.kg <sup>-1</sup> )*	%	%
POP 1	B1/1	5266	701	715	32,20	29,13	615,36 **	74,18 ***	86,42
	B1/2		729		29,80				
	B1/3		715		25,40				
v %		100		14,24		0,64	13,52		
POP 2	B2/1	3366	1367	1316,67	40,00	35,90	550,36 **	71,39 ***	60,88
	B2/2		1278		35,20				
	B2/3		1305		32,50				
v %		100		39,12		1,75	26,86		
POP 3	B3/1	2973	957	849,33	28,50	30,07	322,29 **	83,81 ***	71,43
	B3/2		778		31,80				
	B3/3		813		29,90				
v %		100		28,57		1,01	15,18		
označení odkaliště	označení vzorku	vstupní hodnoty <sup>a)</sup>	zůstatek v sedimentu <sup>a)</sup>	průměr	převod do roztoku	průměr	biomasa průměr <sup>b)</sup>	celková biovolatilizace	% odstranění As ze vstupu pomocí rodu <i>Aspergillus</i>
		(mg.kg <sup>-1</sup> )	(mg.kg <sup>-1</sup> )	(mg.kg <sup>-1</sup> )	(mg.kg <sup>-1</sup> )*	(mg.kg <sup>-1</sup> )	(mg.kg <sup>-1</sup> )	%	%
POP 1	A1/1	5266	674	719	50,00	48,20	2572	42,72	86,9
	A1/2		815		47,60				
	A1/3		670		47,00				
v %		100		13,65		1,05	56,23		
POP 2	A2/1	3366	532	508,33	33,50	41,63	2621	6,82	84,9
	A2/2		495		45,60				
	A2/3		498		45,80				
v %		100		15,10		1,46	91,72		
POP 3	A3/1	2973	943	851,33	29,30	35,73	1983	4,86	71,36
	A3/2		749		52,60				
	A3/3		862		25,30				
v %		100		28,64		1,68	93,46		

označení odkaliště	označení vzorku	vstupní hodnoty <sup>a)</sup> (mg.kg <sup>-1</sup> )	zůstatek v sedimentu <sup>a)</sup> (mg.kg <sup>-1</sup> )	průměr (mg.kg <sup>-1</sup> )	převod do roztoku (mg.kg <sup>-1</sup> )	průměr (mg.kg <sup>-1</sup> )	biomasa průměr <sup>b)</sup> (mg.kg <sup>-1</sup> )	celková biovolatilizace %	% odstranění As ze vstupu pomocí rodu konsorcia B + A
POP 1	C1/1 C1/2 C1/3	5266	965 926 932	941	26,00 20,70 42,80	29,83	1280	69,71	82,13
v %		100		17,87		0,69	29,60		
POP 2	C2/1 C2/2 C2/3	3366	329 357 346	344	50,20 42,60 43,50	45,43	1143	64,54	89,78
v %		100		10,22		1,50	33,96		
POP 3	C3/1 C3/2 C3/3	2973	973 797 856	875,33	40,40 43,80 42,30	42,17	964	52,03	70,56
v %		100		29,44		2,01	45,96		
označení odkaliště	označení vzorku	vstupní hodnoty <sup>a)</sup> mg.kg <sup>-1</sup>	zůstatek v sedimentu <sup>a)</sup> (mg.kg <sup>-1</sup> )	průměr (mg.kg <sup>-1</sup> )	převod do roztoku (μg.l <sup>-1</sup> )	průměr (μg.l <sup>-1</sup> )	biomasa průměr <sup>b)</sup> (mg.kg <sup>-1</sup> )	celková biovolatilizace %	% odstranění As ze vstupu - kontrola
POP 1	K 1/1 K 1/2 K 1/3	5266	2902 2917 2929	2916	33,10 39,70 70,80	47,87	1271	43,87	44,63
v %		100		55,37		2,04	54,09		
POP 2	K 2/1 K 2/2 K 2/3	3366	1665 2006 1372	1681	63,00 58,70 68,20	63,30	1058	33,38	50,06
v %		100		49,94		3,76	62,86		
POP 3	K 3/1 K 3/2 K 3/3	2973	1175 2049 1132	1452	39,40 42,40 29,40	37,07	973	33,59	51,16
v %		100		48,84		2,44	63,97		

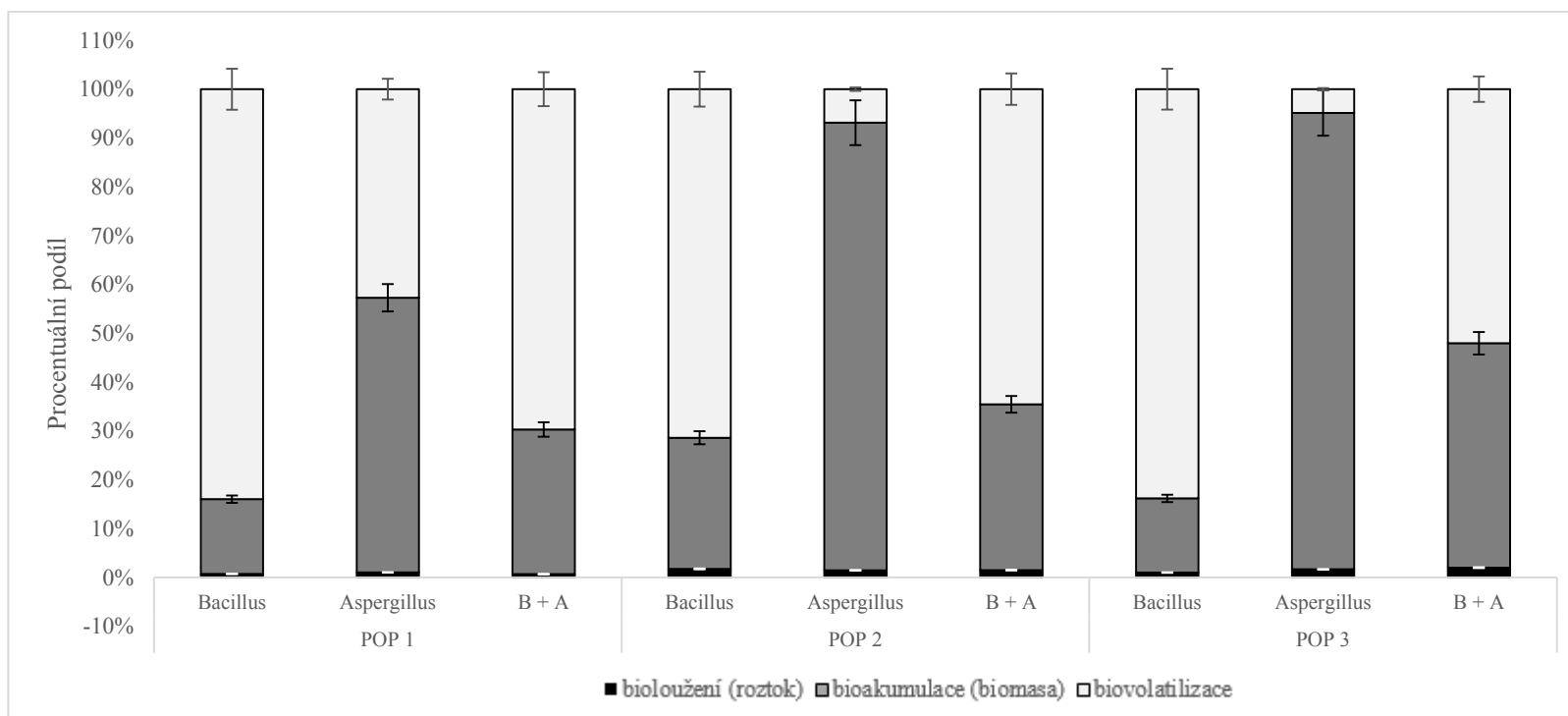
\* přepočítáno z l na kg dle Helmenstine a kol. (2018), tzn. pro vlastnosti vody (densita H<sub>2</sub>O) při 22 °C přepočet 1l = 0,9975 kg

\*\* hodnota odvozená z fumigačně extrakční metody

\*\*\* celková biovolatilizace je pouze odvozená

c) nejistota měření (±10 %)

d) nejistota měření (±20 %)



**Graf 8:** Bioakumulační a biovolatilizační účinnost bakterií rodu *Bacillus*, mikroskopických hub rodu *Aspergillus* a konsorcia těchto mikroorganismů po 30 denním bioloužení arsenu v laboratorních podmínkách

## 4. Shrnutí výsledků

Hlavním cílem disertační práce bylo vytvořit základní charakteristiku mikrobiálního společenstva a biologickou charakteristiku území v posttěžebním prostředí odkaliště Poproč (Slovenská republika), kde byla v minulosti těžena polymetalická ruda a zhodnotit tak stav a současnou míru kontaminace zasaženého území, neboť stav mikrobioty je výchozím indikátorem revitalizace starých technogenních environmentálních zátěží.

Biologická charakteristika území zahrnovala měření abundance a biologické diverzity půdních mikroorganismů, měření mikrobiální biomasy a měření celkového organického uhlíku, včetně identifikace kultivovatelných druhů indigenních mikroorganismů. V práci bylo za pomoci fenotypové identifikace (systém BIOLOG) a genotypové identifikace (PCR) zjištěno celkem 31 bakteriálních druhů s nejvyšším zastoupením taxonomické skupiny *Firmicutes* (61,29 %), která byla ve všech vzorcích ze studovaných substrátů, přičemž druhoví zástupci rodu *Bacillus* představovali majoritní část kultivovatelných bakterií ve většině vzorků (41,94 %). Na základě podrobnější taxonomické analýzy bylo také zjištěno 21 druhů mikroskopických vláknitých hub. Z výsledků výskytu mikroskopických hub ve vzorcích vyplývá, že *Ascomycota* (68,18 %) byla nejpočetnější taxonomická skupina s nejvyšší četností v rodě *Aspergillus* (28,57 %). Hodnoty mikrobiální biomasy byly stanovené pomocí fumigačně-extrakční metody, kdy jako velmi podobné se ukázaly výsledky vzorků z prvního (POP1) a druhého (POP2) odkaliště. Jejich průměrná hodnota se pohybovala v rozmezí 550,36  $\mu\text{g C}$  – 615,63  $\text{C } \mu\text{g/g}$  substrátu. Tyto hodnoty lze vysvětlit vyšším podílem fytocenózy v této lokalitě – v místě odkaliště POP1 je již souvislý rostlinný porost, především z mechu a nízké vegetace, který tak vytváří vhodnější mikroklimatické podmínky pro existenci půdních mikroorganismů (z POP1 bylo izolováno s nejvyšší abundancí 22 druhů bakterií, z toho 13 druhů rodu *Bacillus* a 16 mikroskopických vláknitých hub, z toho 6 druhových zástupců rodu *Aspergillus*). Aktivitu půdní mikrobiální biomasy lze také úzce spojit s vlhkostí půdy, teplotou půdy a zejména s biologickou využitelností organických látek. Nejnížší hodnoty mikrobiální biomasy byly zjištěny ve vzorcích substrátů z třetího odkaliště (POP3 – 309,19  $\text{C } \mu\text{g/g}$  substrátu), kdy tento výsledek lze dát do souvislosti s omezenou dostupností organických látek v daném půdním typu jílovité půdy, čímž dochází ke snížení

dostupnosti živin pro mikroorganismy a v konečném důsledku tak k omezenému zapojení mikroorganismů do biogeochemických cyklů. V souvislosti s mikrobiální biomasou byly změřeny také průměrné hodnoty bazálního a po-titračního dýchání, které korelují s výsledky podílu vegetace a vysokými obsahy potenciálně toxických polokovů (zejména As a Sb). Výsledky identifikace mikroorganismů této práce lze považovat za významné, neboť půdní mikrobiální indikátory antropogenně znečištěného prostředí ukazují na mikrobiální stabilitu ve sledovaném území i adaptaci mikroorganismů vůči toxickým a potenciálně toxickým kovům a polokovům.

Sledování stavu mikrobioty úzce souvisí s dílčími cíly disertační práce, jejichž součástí bylo zhodnocení geochemických vlastností substrátů z odkaliště (především analýzy aktuálních koncentrací toxických a potenciálně-toxických kovů, dále fyzikální, chemické a geo-chemické charakteristiky substrátu) a ověření biotransformační aktivity vybraných autochtonních mikroorganismů – bakterií a mikroskopických vláknitých hub v uvolňování antimonu a arsenu z prostředí odkaliště, neboť jejich diverzita a abundance v prostředí má přímý vliv na výslednou geochemii sledovaných toxikantů. V procesech experimentální biotransformace byly přednostně aplikovány nové autochtonní izoláty biodegradčních bakterií rodu *Bacillus* a mikroskopických vláknitých hub rodu *Aspergillus*, které byly izolovány z technogenních substrátů odkaliště Poproč.

Při opakovaných analýzách se ukázalo, že většina odebraných substrátů má středně kyselé pH (hodnoty  $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}}$  4,5 až 5,3 a hodnoty  $\text{pH}_{\text{KCl}}$  4,0 až 5,3). Celkový organický uhlík byl v rozmezí od 0,15 % do 0,20 % a hodnoty obsahu základních toxických kovů a polokovů stále vysoce překračuje mezní hodnoty. Z výsledků vyplývá, že stále zůstává nejvyšší kontaminace arsenem a antimonem ( $\text{As} \geq 5266 \text{ mg.kg}^{-1}$ ,  $\text{Sb} \geq 16455 \text{ mg.kg}^{-1}$ ). Pomocí biotransformačních procesů byla potvrzena schopnost aplikovaných mikroorganismů – bakterií rodu *Bacillus* a mikroskopických vláknitých hub *Aspergillus* bioakumulovat a biovolatilizovat As a Sb, přičemž bylo zjištěno, že mikroskopické houby *Aspergillus* byly schopny akumulovat ve své biomase všechny analyzované chemické prvky lépe než bakterie rodu *Bacillus*. Z výsledků experimentálního bioloužení vyplývá, že pomocí bakterií bylo průměrně odstraněno 73,33 % Sb a 72,91 % As a pomocí hub bylo průměrně odstraněno 82,75 % Sb a 81,03 % As. Výsledky bioakumulace Sb a As bakteriemi byly poměrně nízké – 5,98 % Sb a 18,52 % As, naopak, biovolatilizační schopnost bakterií byla u antimonu 93,50 % a u arsenu 76,46 %. V porovnání s výsledky

pro bakterie, celková bioakumulace Sb pomocí mikroskopických hub činila 22,35 % a u As 80,47 %, biovalatilizační schopnost byla vypočítána u antimonu na 76,42 % a u arsenu na 18,13 %. Tyto výsledky dokládají, že je možné použít uvedené mikroorganismy jako levné a účinné strategie pro bioremediaci arsenu a antimonu z půdních substrátů.

## 5. Závěr

Těžební průmysl má stále významný vliv na stav životního prostředí, neboť těžba, dobývání a následné využívání nerostných surovin znamená vždy podstatný zásah do přírodních a geologických poměrů daného území. Vlivem těchto zásahů dochází k významným změnám krajinného rázu i přírodního stavu prostředí, což se projevuje i v narušení a úbytku půdního fondu včetně poklesu diverzity indigenních organismů. V posttěžebních lokalitách je pak velice vhodné vyhodnotit *in situ* činnost autochtonní mikroflóry, která je základním indikátorem ekologického stavu daného území i ukazatelem postupující revitalizace a rozvoje organismů vyšších řádů.

Disertační práce byla zaměřena na hodnocení stavu mikrobioty v odkalištích Poproč v místech po těžbě antimonové rudy. K hodnocení stavu indigenní mikrobioty bylo využito nejen metod fyzikálních, chemických, biologických a biochemických ve smyslu ukazatele – charakteristiky indikující obecný stav mikrobioty, ale také hodnocení abundance a diverzity mikroorganismů na základě izolace převažujících rodů a druhů v substrátech odkališť. Diverzita mikroorganismů byla hodnocena na základě profilování jejich metabolitů, obecně byly hledány korelace mezi využíváním substrátu, růstem, antimikrobiální aktivitou a přítomností odpovědných sekundárních metabolitů. K identifikaci mikroorganismů byl využit identifikační systém BIOLOG, který dokáže využívat přednastavené utilizační testy k hodnocení tvorby sekundárních metabolitů, které ve spojení s fyziologií vykazují identifikační charakteristiky izolovaných kmenů indigenní mikrobioty. Práce se také zaměřila na chemickou, biologickou a fyzikální charakteristiku půdních substrátů.

Výsledky hodnocení stavu mikrobiální diverzity v odkališti Poproč potvrdily převažující přítomnost grampozitivních bakterií rodu *Bacillus* a mikroskopických vláknitých hub rodu *Aspergillus* a *Penicillium*, které mohou dobře přežívat v kov-kontaminovaných lokalitách a jsou schopny adaptace na podmínky kovové kontaminace, zejména arsenem a antimonem. Tímto práce potvrzuje také výsledky mnoha jiných vědeckých studií, ze kterých vyplývá, že uvedené mikroorganismy přežívají v prostředí vysokých koncentrací toxických kovů a polokovů díky široké rozmanitosti svých metabolických a adaptačních drah. Koncentrace antimonu a arsenu jsou dva zjevné faktory, které zásadně ovlivňují strukturu mikrobiálních populací v daném místě. Proto



byla část disertační práce zaměřena také na biotransformační procesy těchto polokovů (bioakumulace, biomethylace a biovolatilizace), neboť se ukázalo, že zásadní roli při šíření rezistence vůči iontům kovů a polokovů v přírodě má horizontální přenos genů, který v konečném důsledku vede k adaptaci blízce příbuzných mikroorganismů na genomové úrovni. Vzhledem k tomu, že Sb a As patří v periodické tabulce do stejné skupiny polokovů a mají téměř shodné oxidační stavy, lze očekávat, že také v procesech biotransformace a detoxikace obou prvků se v buňkách mikroorganismů uplatňují obdobné funkční systémy.

Výsledky bioloužících experimentů prokázaly, že vhodné konsorcium autochtonní mikrobioty z odkaliště může být využito v biotechnologickém průmyslu při sanačních procesech průmyslově zatížených půd a technogenních (půdních) substrátů.

## 6. Seznam použité literatury

- [1] AKMAL, M., J. XU, Z. LI a H. WANG. Effects of lead and cadmium nitrate on biomass and substrate utilization pattern of soil microbial communities. *Chemosphere*. 2005, roč. 4, č. 60, s. 508-514; DOI:10.1016/j.chemosphere.2005.01.001
- [2] BLOEM, J. a A. M. BREURE. Microbial indicators. *Trace Metals and other Contaminants in the Environment*. 2003, roč. 3, č. 6, s. 259-282; DOI:10.1016/S0927-5215(03)80138-8
- [3] BROOKERS, P. C. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metal. *Biology and Fertility of Soil*. 1995, roč. 19, s. 269-279. ISSN 0178-2762
- [4] BURNS, M., N. YAN, P. MARCHNER a W. QIN. Influence of salinity and water content on soil microorganisms. *International Soil and Water Conservation Research*. 2006, roč. 4, č. 3, 316-323; DOI:10.1016/j.iswcr.2015.11.003
- [5] FEKETEOVÁ, Z., V. HULEJOVÁ SLÁDKOVIČOVÁ, B. MANGOVÁ a I. ŠIMKOVIC. Biological activity of the metal-rich post-flotation tailings at an abandoned mine tailings pond (four decades after experimental afforestation). *Environmental Science and Pollution Research*. 2016, roč. 16, č. 22, s. 12174-12181; DOI:10.1007/s11356-015-4489-4
- [6] GRECULA, P. *Ložiská nerastných surovín Slovenského rudohoria*. Zväzok 1. Preložil Zoltán NÉMETH, preložil Imrich VARGA. Bratislava: Geocomplex, 1995. Mineralia Slovaca - Monografie. ISBN 80-967018-2-7.
- [7] HUDSON-EDWARDS, K. A., S. L. HOUGHTON a A. OSBORN. Extraction and analysis of arsenic in soils and sediments. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2004, roč. 10/11, č. 23, s. 745-752; DOI:10.1016/j.trac.2004.07.010
- [8] JORDAN, D., R. J. KREMER, W. A. BERGFELD, K. Y. KIM a V. N. CACNIO. Evaluation of microbial methods as potential indicators of soil quality in historical agricultural fields. *Biology and Fertility of Soil*. 1995, roč. 19, s. 297-302. ISSN 0178-2762

- [9] JURKOVIČ, Ľ., P. ŠOTTNÍK, R. FLAKOVÁ, M. JANKULÁR, Z. ŽENIŠOVÁ a M. VACULÍK. Opustené Sb ložisko Poproč – zdroj kontaminácie prírodných zložiek v povodí Olšavy. *Mineralia Slovaca*. 2010, roč 42, s. 109-120. ISSN 0369-2086
- [10] KALIČIAKOVÁ, E., PACINDOVÁ, N., REPČIAK, M., SELIGA, J. a P. VOLKO. *Poproč – haldy, skládky, odkaliská – VP životné prostredie, stav k 31. 1. 1994. Záverečná správa*. Bratislava: ŠGÚDŠ, archív, 1994
- [11] LIAO, Y., W. WU a F. MENG. Increase in soil organic carbon by agricultural intensification in northern China. *Biogeoscience*. 2007, č. 12, 1403-1413; DOI: 10.5194/bg-12-1403-2007
- [12] NIELSEN, M. N. a A. WINDING. *Microorganisms as Indicators of Soil Health*. Denmark: National Environmental Research Institute, 2002. 388 s. ISBN 87-7772-658-8
- [13] ROZLOŽNÍK, Ľ., J. HAVELKA, F. ČECH a V. ZORKOVSKÝ. *Ložiská nerastných surovín a ich vyhľadávanie*. Bratislava: ALFA – vydavateľstvo technickej a ekonomickej literatúry, 1987, 696 s.
- [14] SCHINNER, F., E. OHLINGER a E. KANDELER. *Methods in Soil Biology*. Berlin: Springer, 1993, 385 s. ISBN 978-3-642-64633-1
- [15] ŠIMONOVÍČOVÁ, A., P. FERIANEC, H. VOJTKOVÁ, D. PANGALLO, P. HANAJÍK, L. KRAKOVÁ, Z. FEKETEHOVÁ, S. ČERNÁNSKÝ, L. OKENICOVÁ, M. ŽEMBERYHOVÁ, M. BUJDOŠ a E. PAUDITŠOVÁ. Alkaline technosol contaminated by former mining activity and its culturable autochthonous microbiota. *Chemosphere*, 2017, č. 171, s. 89-96; DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.11.131
- [16] ŠIMONOVÍČOVÁ A., K. PETKOVÁ, Ľ. JURKOVIČ, P. FERIANEC, H. VOJTKOVÁ, M. REMENÁR, L. KRAKOVÁ, D. PANGALLO, E. HILLER a S. ČERNÁNSKÝ. Autochthonous microbiota in arsenic-bearing technosols from Zemianske Kostol'any (Slovakia) and its potential for bioleaching and biovolatilization of arsenic. *Water, Air, & Soil Pollution*. 2016, roč. 227, s. 336; DOI:10.1007/s11270-016-3038-1

- [17] VANCE, E. D., P. C. BROOKES a D. S. JENKINSON. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry*. 1987, roč. 6, č. 19, s. 703-707; DOI:10.1016/0038-0717(87)90052-6
- [18] VOJTKOVÁ, H. a K. BOTUROVÁ. Rezistence bakteriálních izolátů z odkaliště Poproč s využitím PCR. *GEOCHÉMIA 2018: Zborník vedeckých príspevkov z konferencie*. Bratislava: Štátny geologický ústav Dionýza Štúra, 2018, s. 143-144. ISBN 978-80-8174-036-7
- [19] WANG, Y. P., J. SHI, H. WANG, Q. LIN, X. CHEN a Y. CHEN. The influence of soil heavy metals pollution on soil microbial biomass enzyme activity and community composition near a copper smelter. *Ecotoxicology and Environment Safety*. 2007, roč. 1, č. 67, 75-78; DOI:10.1016/j.ecoenv.2006.03.007
- [20] WINDING, A., K. HUND-RINKE a M. RUTGERS. The use of microorganisms in ecological soil classification and assessment concepts. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2005, roč. 2, č. 62, s. 230-248, DOI:10.1016/j.ecoenv.2005.03.026
- [21] WRIGHT, C. J. a D. C. COLEMAN. Cross-site comparison of soil microbial biomass, soil nutrient status, and nematode trophic groups. *Pedobiologia*. 2000, roč. 1, č. 44, s. 2-23; DOI:10.1078/S0031-4056(04)70024-4
- [22] YUANGEN, Y., C. D. CAMPBELL, L. CLARK, a C. M. CAMERON. Microbial indicators of heavy metal contamination in urban and rural soils. *Chemosphere*. 2006, roč. 11, č. 63, s. 1942-1952; DOI:10.1016/j.chemosphere.2005.10.009
- [23] ZHANG, H., G. SAXENA a G. KAITHWAS. Microbial indicators, pathogens and methods for their monitoring in soil environment. *Environmental Science Technology*. 2015, roč. 2, č. 13, s. 319-339; DOI:10.2166/wh.2014.275